

(19) Eur päisches Patentamt  
European Patent Office  
Office uropéen des brevets



(11) EP 0 672 677 B1

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:  
**03.07.2002 Patentblatt 2002/27**

(21) Anmeldenummer: **95103332.3**

(22) Anmeldetag: **08.03.1995**

(54) **Polyamid-Oligonucleotid-Derivate, deren Herstellung und Verwendung**

Polyamide-oligonucleotide derivatives, their production and use

Dérivés des polyamide-oligonucleotides, leur production et utilisation

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE**

(30) Priorität: **14.03.1994 DE 4408528**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**20.09.1995 Patentblatt 1995/38**

(60) Teilanmeldung:  
**01104012.8 / 1 113 021**

(73) Patentinhaber: **Aventis Pharma Deutschland GmbH  
65929 Frankfurt am Main (DE)**

(72) Erfinder:  

- Uhlmann, Eugen, Dr.  
**D-61479 Glashütten (DE)**
- Breipohl, Gerhard, Dr.  
**D-60529 Frankfurt (DE)**

(56) Entgegenhaltungen:  
**EP-A- 0 552 766 EP-A- 0 552 767**  
**WO-A-92/20702**

• J. CELL BIOCHEM. SUPPL. - KEYSTONE  
 SYMPOSIUM ON RIBOZYMES. (15-21 JAN 1995)  
 MEETING ABSTRACT A6-017, Bd. 19a, 1995  
 BECKENRIDGE, CO, USA, Seite 205 FREIERS.M.  
 ET AL. 'Modified oligonucleotides:  
 Hybridisation properties, pharmacokinetic  
 properties and pharmacological activity.'

EP 0 672 677 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

**B schreibung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue Polyamid-Oligonucleotid-Derivate mit wertvollen physikalischen, biologischen und pharmakologischen Eigenschaften. Ihre Anwendung bezieht sich auf die Verwendung als Inhibitoren der Genexpression (Antisense Oligonucleotide, Ribozyme, Sense Oligonucleotide und Triplex Forming Oligonucleotide), als Sonden zum Nachweis von Nucleinsäuren und als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

[0002] Oligonucleotide finden in wachsendem Maße Anwendung als Inhibitoren der Genexpression (G. Zon, Pharmaceutical Research 5, 539 (1988); J. S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; C. Helene and J. J. Toulme, Biochimica et Biophysica Acta 1049, 99 (1990); E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Antisense Oligonucleotide sind Nucleinsäure-Fragmente, deren Basensequenz komplementär ist zu einer zu inhibierenden mRNA. Diese Target-mRNA kann zellulären, viralen oder sonstigen pathogenen Ursprungs sein. Als zelluläre Target-Sequenzen kommen beispielsweise die von Rezeptoren, Zelladhäsionsproteinen, Enzymen, Immunmodulatoren, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Ionenkanälen oder Onkogenen in Frage. Die Inhibition der Virus Vermehrung mit Hilfe von Antisense Oligonucleotiden wurde beispielsweise für HBV (Hepatitis B Virus), HSV-1 und -2 (Herpes Simplex Virus Typ I und II), HIV (Human Immunodeficiency Virus) und Influenza-Viren beschrieben. Dabei setzt man Oligonucleotide ein, die zur viralen Nucleinsäure komplementär sind. Sense Oligonucleotide sind dagegen in ihrer Sequenz so konzipiert, daß sie beispielsweise Nucleinsäure-bindende Proteine oder Nucleinsäure-prozessierende Enzyme binden ("einfangen") und so deren biologische Aktivität inhibieren (C. Helene and J. J. Toulme, Biochimica et Biophysica Acta 1049, 99 (1990)). Als virale Targets sind hier beispielsweise die Reverse Transkriptase, DNA-Polymerase und Transaktivator-Proteine zu nennen. Triplex Forming Oligonucleotide haben im allgemeinen die DNA als Target und bilden nach Bindung an diese eine triphelhelicale Struktur aus. Während mit Hilfe der Antisense Oligonucleotide im allgemeinen die Prozessierung (Splicing etc.) der mRNA oder deren Translation in das Protein gehemmt wird, hemmen Triplex Forming Oligonucleotide die Transkription oder Replikation der DNA (C. Helene und J.J. Toulme; Biochim. Biophys. Acta 1049 (1990) 99-125; E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Es ist aber auch möglich, einzelsträngige Nucleinsäuren in einer ersten Hybridisierung mit einem Antisense Oligonucleotid unter Ausbildung eines Doppelstranges zu binden, der dann in einer zweiten Hybridisierung mit einem Triplex Forming Oligonucleotid eine Triplex-Struktur ausbildet. Die Antisense und Triplex Bindungsregionen können dabei entweder in zwei separaten Oligonucleotiden oder aber in einem Oligonucleotid beherbergt sein. Eine weitere Anwendung synthetischer Oligonucleotide sind die sogenannten Ribozyme, welche die Target-RNA infolge ihrer Ribonuclease-Aktivität zerstören (J.J. Rossi and N. Sarver, TIBTECH (1990) 8, 179; Castanetto et al., Critical Rev. Eukar. Gene Expr. (1992) 2, 331).

[0003] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch im Sinne von Aptameren in der Therapie eingesetzt werden. Aptamere sind oligomere Nucleinsäuren oder deren Analoga, welche mit hoher Affinität an Proteine binden. Das Auffinden der Aptameren erfolgt durch *in vitro* Selektion aus einem Zufallsgemisch (Famulok und Szostak (1992) Angew. Chem. 104, 1001-1011) und wurde für ein Thrombin-bindendes Aptamer erfolgreich durchgeführt (Bock et al. (1992) Nature 355, 564-566). Man kann dabei so verfahren, daß die Basenfolge des Aptamers durch Screening eines Oligonucleotid-Gemisches bestimmt wird und diese Basensequenz dann auf Polyamid-Oligonucleotid-Analoga übertragen wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die bindende Region des Aptamers zur Erleichterung der Identifikation durch einen separaten nichtbindenden Teil des Moleküls codiert wird (Brenner und Lerner (1992) PNAS 89, 5381-5383).

[0004] In der DNA-Diagnostik werden Nucleinsäure-Fragmente mit geeigneter Markierung als sogenannte DNA-Sonden oder DNA-Probes für die spezifische Hybridisierung an eine nachzuweisende Nucleinsäure eingesetzt. Die spezifische Ausbildung des neuen Doppelstranges wird dabei mit Hilfe der Markierung, die vorzugsweise nicht radioaktiv ist, verfolgt. Auf diese Weise lassen sich genetische, maligne, virale oder durch andere pathogene verursachte Krankheiten nachweisen.

[0005] Für die meisten genannten Anwendungen sind Oligonucleotide in ihrer natürlich vorkommenden Form wenig oder völlig ungeeignet. Sie müssen chemisch so modifiziert werden, daß sie den speziellen Anforderungen gerecht werden. Damit Oligonucleotide in biologischen Systemen, beispielsweise zur Inhibition der Virus-Vermehrung eingesetzt werden können, müssen sie folgende Voraussetzungen erfüllen:

- 50 1. Sie müssen unter *in vivo* Bedingungen, also sowohl im Serum als auch intrazellulär, eine ausreichend große Stabilität aufweisen.
2. Sie müssen so beschaffen sein, daß sie die Zell- und Nucleus-Membran passieren können.
3. Sie müssen unter physiologischen Bedingungen in Basen-spezifischer Weise an ihre Target-Nucleinsäure binden, um den inhibitorischen Effekt zu entfalten.

[0006] Für DNA-Sonden sind die Punkte 1 bis 3 keine Voraussetzung; jedoch müssen diese Oligonucleotide so derivatisiert sein, daß ein Nachweis, beispielsweise mittels Fluoreszenz, Chemilumineszenz, Kolorimetrie oder spezi-

fischer Färbung, möglich ist (Beck und Köster, Anal. Chem. 62, 2258 (1990)).

**[0007]** Die chemische Veränderung der Oligonucleotide erfolgt meistens in der Weise, daß Phosphatrückgrat, Ribose-Einheit oder die Nucleobasen entsprechend verändert werden (J. S. Cohen, Topics in Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; E. Uhlmann and A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Eine weitere häufig genutzte Methode ist die Herstellung von Oligonucleotid-5'-Konjugaten durch Umsetzung der 5'-Hydroxy-Gruppe mit entsprechenden Phosphorylierungs-Reagenzien. Wenn dagegen alle Internucleotid-Phosphat-Reste verändert werden, verändern sich die Eigenschaften der Oligonucleotide oft drastisch. Beispielsweise ist die Löslichkeit von Methylphosphonaten in wässrigem Medium stark vermindert, während All-Phosphorothioat-Oligonucleotide oft sequenzspezifisch wirken.

**[0008]** Kürzlich wurden Polyamid-Nucleinsäure-Derivate beschrieben (Michael Egholm, Peter E. Nielsen, Rolf H. Berg and Ole Buchardt, Science 1991, 254, 1497-1500; WO 92/20702; M. Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568; P. Nielsen, (1994) Bioconjugate Chem. 5, 3-7), die mit höherer Affinität als natürliche Oligonucleotide an komplementäre Zielsequenzen (DNA oder RNA) binden. Diese sogenannten Peptide bzw. Polyamide Nucleic Acids (PNA) sind DNA-analoge Verbindungen, in denen das Deoxyribose-Phosphat-Gerüst durch ein Polyamid-Oligomer ersetzt wurde. Diese Verbindungen haben den Vorteil gegenüber den natürlichen Oligonucleotiden, daß sie im Serum sehr stabil sind. Sie haben aber andererseits folgende nachteilige Eigenschaften:

(1) Sie werden nicht bzw. nur in nicht nachweisbarer Menge in Zellen aufgenommen. Da Antisense oder Triplex-Forming Oligonucleotide ihre Aktivität aber nur in der Zelle entfalten können, sind die PNA's als solche ungeeignet zur Inhibition der Genexpression in vivo.

(2) Die PNA's tendieren in wässriger Lösung, also auch unter physiologischen Bedingungen zur Aggregation. Sie sind daher in wässrigem Puffer schlecht löslich und stehen nicht für die Hybridisierung an komplementäre Sequenzen zur Verfügung.

(3) Die PNA's haben zudem eine hohe Affinität zu verschiedenen Materialien wie @Sephadex (Fa. Pharmacia) oder @Bond Elut (Fa. Varian), die bei der Aufreinigung der Oligomeren Verwendung finden, so daß die PNA's oft nur in schlechten Ausbeuten zu isolieren sind.

(4) Ein weiterer gravierender Nachteil der PNA's besteht darin, daß sie nicht in einer eindeutigen Orientierung an komplementäre Nucleinsäuren binden. Deshalb ist die Sequenzspezifität gegenüber den natürlichen Oligonucleotiden reduziert. Während natürliche Nucleinsäuren an komplementäre Nucleinsäuren im allgemeinen in antiparalleler Orientierung hybridisieren, können PNA's sowohl in antiparalleler als auch in paralleler Orientierung binden.

(5) In WO 92/20702 ist ein Oligonucleotid-PNA-Konjugat (T)<sub>7</sub>(5'-L-N)(t)<sub>6</sub>-Ala erwähnt (Fig. 25; substitute sheet), wobei (T)<sub>7</sub> ein natürliches Heptathymidylat Oligonucleotid bedeutet, das über sein 5'-O-Phosphat und 4-Hydroxybuttersäure (L) an die primäre Aminofunktion (N) eines PNA-Hexathymidylats (t)<sub>7</sub> und Alanin (Ala) gebunden ist. Es wurden weder Synthese dieser Verbindung noch irgendwelche Eigenschaften beschrieben.

(6) PNA's zeigen in Zellkulturexperimenten im µmolaren Bereich stark cytotoxische Eigenschaften.

**[0009]** Die Orientierung der basenpaarenden Nucleinsäurestränge ist wie folgt definiert: (vgl. Egholm et al.; Nature 365 (1993) 566-568).

40

45

50

55

A)

5' ----- 3'      DNA      ap Duplex    ap = antiparallel  
3' ----- 5'      DNA

B)

10      5' ----- 3'      DNA      p Duplex    p = parallel  
5' ----- 3'      DNA

C)

15      5' ----- 3'      DNA      ap Duplex (DNA·PNA)  
20      C ----- N      PNA

D)

25      5' ----- 3'      DNA      p Duplex (DNA·PNA)  
N ----- C      PNA

30

35

40

45

50

55

E)

C ----- N

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) ap·ap Triplex (DNA·DNA·PNA)

3' ----- 5'

DNA Pu = Purin-reicher Strang

10

F)

N ----- C

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) ap·p Triplex (DNA·DNA·PNA)

3' ----- 5'

DNA

20

G)

N ----- C

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) ap·p Triplex (PNA·DNA·PNA)

C ----- N

PNA

30

H)

C ----- N

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) ap·ap Triplex (PNA·DNA·PNA)

C ----- N'

PNA

40

I)

N ----- C

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) p·p Triplex (DNA·DNA·PNA)

45

N ----- C'

PNA

50

K)

C ----- N

PNA

5' ----- 3'

DNA (Pu) p·ap Triplex (DNA·DNA·PNA)

55

N ----- C

PNA

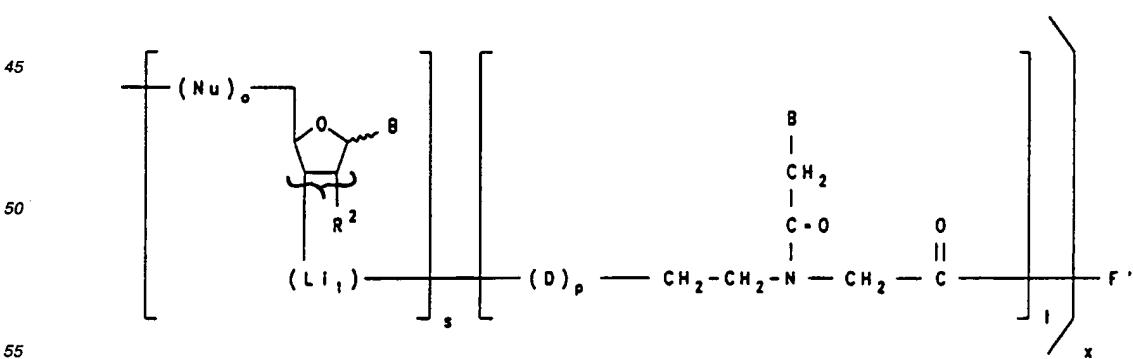
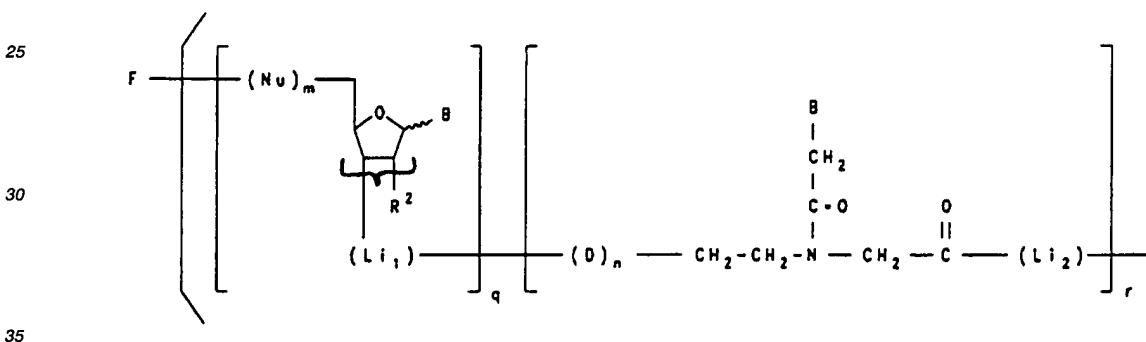
wobei

- 5' das 5'-Ende eines Oligonucleotids,
- 3' das 3'-Ende eines Oligonucleotids,
- 5 N den Aminoterminus eines PNA's
- C den Carboxyterminus eines PNA's bedeuten.

[0010] Die Fälle A) - D) sind beispielhaft für die prinzipiell möglichen Orientierungsarten der Antisense-Oligomeren.  
 10 Die Fälle E) - F) zeigen Möglichkeiten der Triplexbildung an einzelsträngigen oder doppelsträngigen Nucleinsäuren.  
 Dabei können zwei der PNA- bzw. DNA-Einzelstränge miteinander verknüpft sein. Beispielsweise kann in E) der N-Terminus des PNA's mit dem 5'-Ende der DNA oder in F) der C-Terminus des PNA mit dem 5'-Ende der DNA verknüpft sein.

[0011] Die Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Polyamid-Oligonucleotid-Derivate herzustellen, in denen oben genannten Nachteile eliminiert sind.

[0012] Gegenstand der Erfindung sind Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel I a, sowie deren physiologisch verträgliche Salze,  
 15 in der x für 1 steht und gleichzeitig  
 $q = r = 1$  und  $s = t = \text{Null}$  oder  
 $r = s = 1$  und  $q = t = \text{Null}$  oder  
 $q=r=s=1$  und  $t = \text{Null}$   
 20 sind.



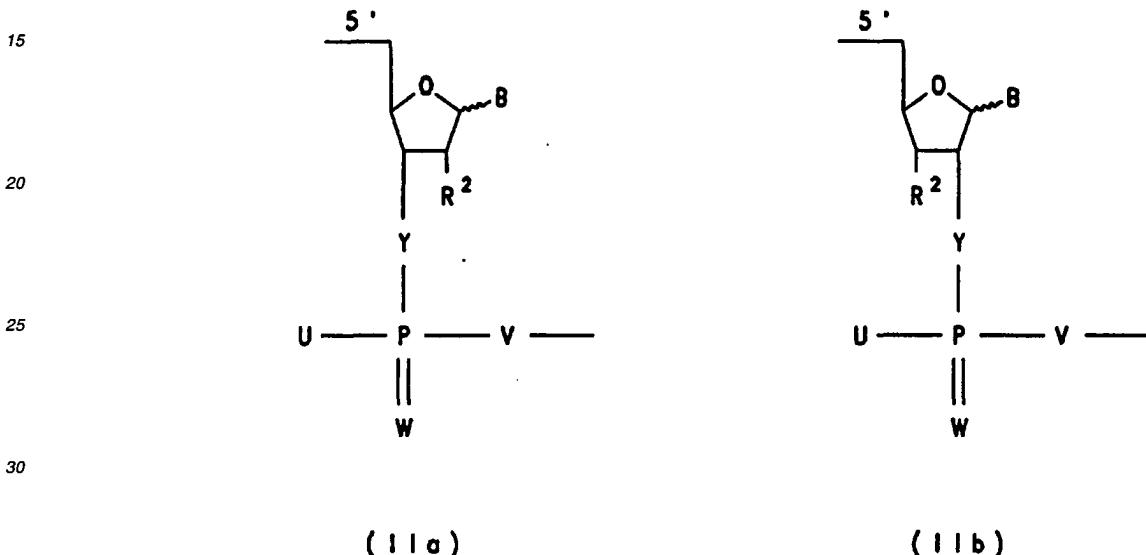
worin

R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, Halogen, wie F oder Cl, bevorzugt F, Azido oder Amino bedeutet;

B unabhängig voneinander für eine in der Nucleotidchemie übliche Base, beispielsweise für natürliche Basen wie Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin, Uracil, Inosin oder unnatürliche Basen wie beispielsweise Purin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, Pseudoisocytosin, 5-Methylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyluracil oder 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkinylcytosin steht,

5 und die "geschweifte Klammer" andeutet, daß sich R<sup>2</sup> und der benachbarte Substituent in 2'- und 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können und wobei die Polyamidstruktur mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist;

10 Nu für einen Rest der Formeln IIa oder IIb steht



35 worin

R<sup>2</sup> und B wie oben definiert sind;

40 U Hydroxy, Mercapto, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkoxy, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Aryl, bevorzugt C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>-Aryl, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl, bevorzugt C<sub>6</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl, NHR<sup>3</sup> oder NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> bedeutet und

45 R<sup>3</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl ist, vorzugsweise C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl, besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl oder Methoxyethyl und

R<sup>4</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, vorzugsweise C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl und besonders bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, ist oder

50 R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeutet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann, wie beispielsweise Morphin;

V Oxy, Sulfanidyl oder Imino bedeutet;

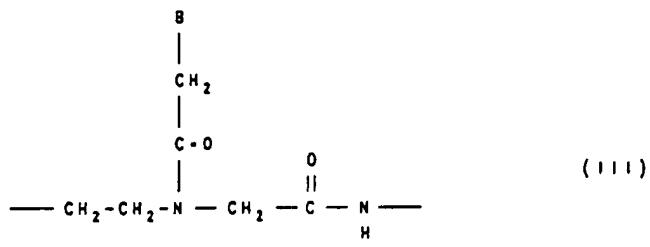
W Oxo oder Thioxo bedeutet;

Y Oxy, Sulfanidyl, Methylen oder Imino bedeutet;

m = Null bis 20;

o = Null bis 20;

D einen Rest der Formel III bedeutet



worin B wie oben definiert ist;

n = Null bis 20;

p = Null bis 20;

15 Li<sub>1</sub> und Li<sub>2</sub> unabhängig voneinander jeweils eine Struktur der Formel V

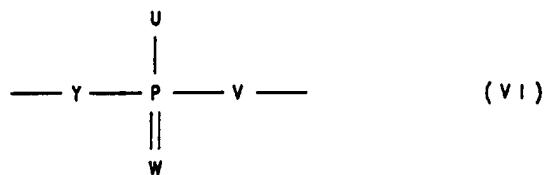
$$[(V') - (G) - (G')]_{\epsilon} \quad (V)$$

ist, wobei unabhängig voneinander

$\varepsilon$  = 1 bis 5, bevorzugt 1 - 2 ist,

V' Sauerstoff, NH, eine Bindung oder einen Rest der Formel VI

25



**bedeuten,**

35

worin U, V, W und Y wie oben definiert sind:

**G** C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkandiy, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkandiy, wobei Alkandiy gegebenenfalls durch Halogen, bevorzugt F oder Chlor, Amino, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, bevorzugt C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkoxy, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl, bevorzugt C<sub>6</sub>-Aryl, oder C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>6</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl substituiert sein kann; C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-di-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkandiy, bevorzugt C<sub>6</sub>-Aryl-di-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkandiy, oder einer Gruppe der Formel (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>δ</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, worin δ gleich 1 bis 11, bevorzugt 1 bis 7 sein kann; oder für eine Bindung stehen kann; und

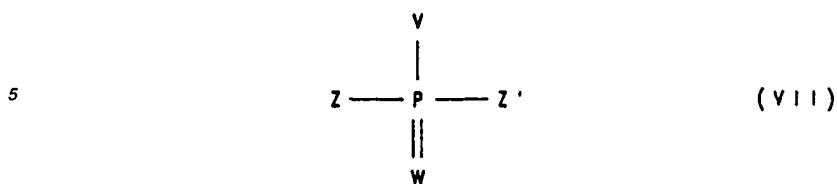
G' Oxy, Sulfanidyl, Imino,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ , eine Bindung oder einen Rest der Formel VI bedeuten, worin U, V, W und Y wie oben definiert sind; und

45 F und F' über eine Bindung verknüpft sind (cyclische Verbindungen) und/oder  
F und F' Endgruppen sind, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, die die Markierung ermöglichen.

F für R<sup>0</sup> - (A)<sub>k</sub> - V- und  
F' in Formel 1a für -(C) - R<sub>1</sub> steht

50 in Formel la für - ( $\square$ )<sub>i</sub> - R<sup>1</sup> steht, wobei:

55 R<sup>0</sup>Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkanoyl, bevorzugt C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>-Alkanoyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy carbonyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cyclo-alkanoyl, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-Aroyl, C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub>-Heteroaroyl oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift; oder,  
falls k = Null ist, R<sup>0</sup> Wasserstoff ist oder zusammen mit V für einen Rest der Formel VII



10

steht, worin

Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Aryl, bevorzugt C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>-Aryl, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>6</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylothio, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkylothio, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und worin

15

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, V und W wie oben definiert sind;

20

R<sup>1</sup> Wasserstoff oder Q°

wobei R<sup>1</sup> immer nur dann Wasserstoff ist,  
wenn gleichzeitig I = Null und

25

in Formel Ia t = Null und s = 1 und Li<sub>1</sub> eine Struktur der Formel V mit V' = Bindung, G = Bindung, ε = 1 und G' = Oxy, Sulfanidyl, Imino oder einen Rest der Formel VI mit U = Z bedeuten,

30

A und Q unabhängig voneinander den Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure, bevorzugt aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure, N-(2-Aminoethyl)glycin bedeuten;

35

Q°

Hydroxy, OR', NH<sub>2</sub>, NHR" bedeutet mitR' = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl undR" = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Aminoalkyl, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Aminoalkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Hydroxyalkyl, bevorzugt C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>-Hydroxyalkyl;

V

wie oben definiert ist;

k

Null bis 10 ist;

l

Null bis 10 ist;

40

mit der Maßgabe, daß

- a) falls in der Verbindung der Formel Ia t = Null und s = 1 sind, und Li<sub>1</sub> = (V') - (G) - (G') mit V' = Verbindung der Formel VI, G = C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-Alkylen und G' = CO stehen, bedeutet in F' = - (Q)<sub>1</sub> - R<sup>1</sup> I = Null bis 10 und R<sup>1</sup> = Q°;  
b) falls in der Verbindung der Formel Ia s = t = Null ist, steht Li<sub>2</sub> für eine Bindung;

45

wobei jedes Nucleotid in seiner D-Konfiguration vorliegt und sich die Base in α- oder β-Stellung befinden kann.

[0013] Besonders bevorzugt sind Verbindungen der Formel Ia, in der sich die Base am Zucker in β-Stellung befindet, x = 1 ist und

q=r=1, s=t=Null oder

50

r=s=1, q=t=Null oder

q=r=s=1, t=Null

sind.

[0014] Insbesondere bevorzugt sind Oligomere der Formel Ia, worin V', V, Y und W die Bedeutung von Thio, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben; ganz besonders bevorzugt sind diese, falls zusätzlich R<sup>2</sup> gleich Wasserstoff ist.

55

[0015] Insbesondere bevorzugt sind auch Oligomere der Formel Ia mit ε=1, in denen

- Li<sub>1</sub> a) eine Verbindung der Formel V, in der V'=Sauerstoff oder eine Verbindung der Formel VI, G= C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen, G'=-CONH -

b) eine Verbindung der Formel V, in der G, V' eine Bindung und G' eine Verbindung der Formel VI ist mit bevorzugt U=V=W=Y=Sauerstoff oder U=W=Y=Sauerstoff und V=Imino

- 5 Li<sub>2</sub> a) eine Verbindung der Formel V mit V'=Imino, G= C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen und G'= Verbindung der Formel VI  
 b) eine Verbindung der Formel V mit V'=Imino, G und G'= Bindung  
 c) eine Verbindung der Formel V mit V'=Imino, G= C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylen und G'= V mit bevorzugt U=V=W=Y=Sauerstoff.

10 [0016] Ganz besonders bevorzugt sind Oligomere der Formel Ia, worin V', V, Y und W die Bedeutung von Thio, Oxy, Oxo oder Hydroxy haben, R<sup>2</sup> gleich Wasserstoff ist, Li<sub>1</sub> die Bedeutung von -V'-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>C(O)NH- mit V' = Verbindung der Formel VI mit U=V=W=Y=Sauerstoff oder Li<sub>2</sub> die Bedeutung von -HN-[CH<sub>2</sub>]<sub>n</sub>(G')- haben, wobei n= 2 bis 5 und G' gleich der Formel VI mit U, V, W und Y=Sauerstoff ist.

15 [0017] Bevorzugt sind außerdem Oligomere der Formel Ia, worin die geschweifte Klammer bedeutet, daß sich R<sup>2</sup> in 3' Stellung (siehe Formel IIb) befindet. Die bevorzugte Base ist hierbei Adenin.

15 [0018] Die Erfindung ist nicht auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Ribofuranoside,  $\alpha$ - und  $\beta$ -D-Desoxyribofuranoside und entsprechende carbocyclische Fünfringanaloga beschränkt, sondern gilt auch für Oligonucleotidanaloga, die aus anderen Zucker-Bausteinen aufgebaut sind, beispielsweise ringerweiterte und ringverengte Zucker, acyclische, ringverbrückte oder geeignete andersartige Zucker-Derivate. Die Erfindung ist ferner nicht auf die in Formel Ia beispielhaft aufgeführten Derivate des Phosphat-Restes beschränkt, sondern bezieht sich auch auf die bekannten Dephospha-Derivate.

20 [0019] Der Oligonucleotid-Teil (DNA in Formel Ia) kann also in vielfältiger Weise von der natürlichen Struktur abgewandelt sein. Solche Modifikationen, die nach an sich bekannten Methoden eingeführt werden, sind beispielsweise:

a) Modifikationen der Phosphatbrücke

Beispielhaft seien genannt: Phosphorothioate, Phosphorodithioate, Methylphosphonate, Phosphoramidate, Boranophosphate, Phosphatemylester, Phosphateylester, Phenylphosphonate. Bevorzugte Modifikationen der Phosphatbrücke sind Phosphorothioate, Phosphorodithioate und Methylphosphonate.

b) Ersatz der Phosphatbrücke

Beispielhaft seien genannt: Ersatz durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylenimethylhydrazo, Dimethylenulfon, Silylgruppen. Bevorzugte ist der Ersatz durch Formacetale und 3'-Thioformacetale.

c) Modifikationen des Zuckers

Beispielhaft seien genannt:  $\alpha$ -anomere Zucker, 2'-O-Methylribose, 2'-O-Butylribose, 2'-O-Allylribose, 2'-Fluoro-2'-desoxyribose, 2'-Amino-2'-desoxyribose,  $\alpha$ -Arabinofuranose, Carbocyclische Zuckeranaloge. Bevorzugte Modifikation ist die durch 2'-O-Methylribose und 2'-O-n-Butylribose.

d) Modifikationen der Basen welche die Spezifität der Watson-Crick Basenpaarung nicht verändern

Beispielhaft seien genannt: 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Propinyl-2'-desoxycytidin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin, 5-Fluoro-2'-desoxycytidin, 5-Fluor-2'-desoxyuridin, 5-Hydroxymethyl-2'-desoxyuridin, 5-Methyl-2'-desoxycytidin, 5-Brom-2'-desoxycytidin. Bevorzugte Modifikationen sind 5-Propinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxyuridin, 5-Hexinyl-2'-desoxycytidin und 5-Propinyl-2'-desoxycytidin.

e) 3'-3'- und 5'-5'-Inversionen [z.B. M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757]

f) 5'- und 3'-Phosphate, sowie 5'- und 3'-Thiophosphate.

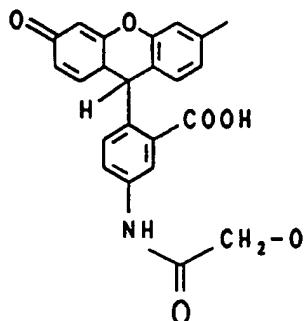
50 [0020] Beispielhaft für Gruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen, sind verschiedene lipophile Reste wie -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-CH<sub>3</sub>, worin x eine ganze Zahl von 6 bis 18 bedeutet, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub>, worin n und m unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 6 bis 12 bedeuten, -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>, -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub> und -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>, aber auch Steroid-Reste wie Cholesterin oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur receptorvermittelten Endozytose der Oligonucleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Unter Markierungs-Gruppen sind fluoreszierende Gruppen beispielsweise von Dansyl-( = N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten zu verstehen sowie das über ELISA nachweisbare Digoxygenin-System, die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe oder aber Linker-Arme mit

funktionellen Gruppen, die eine nachträgliche Derivatisierung mit nachweisbaren Reporter-Gruppen gestatten, beispielsweise ein Aminoalkyl-Linker, der mit einem Acridinium-Aktivester zur Chemilumineszenz-Probe umgesetzt wird. Typische Markierungsgruppen sind:

5

10

15



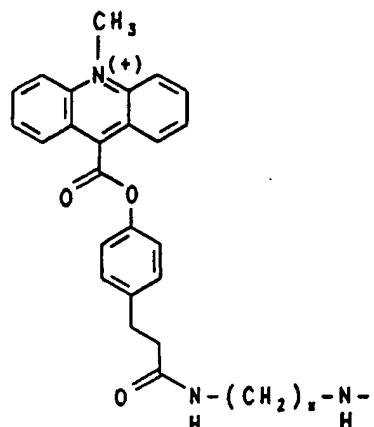
20

## Fluorescein-Derivat

25

30

35



40

## Acridinium-Ester

45

$x = 2-18$  bevorzugt 4  
 $R = H$  oder  $C_1-C_4$ -Alkyl  
 (= "Fluorescein" für  $x = 4$  und  $R = CH_3$ )

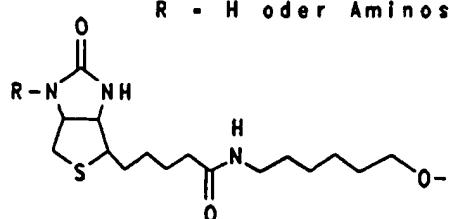
50

## Fluorescein-Derivat

55

R = H oder Aminoschutzgruppe

5



10

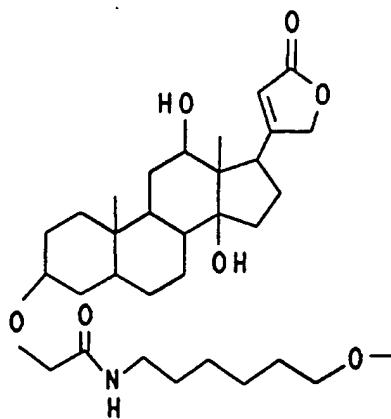
Biotinkonjugat (= "Biotin" fuer R = Fmoc)

15

20

25

30

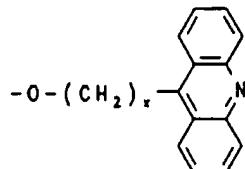


35

## Digoxigeninkonjugat

[0021] Oligonucleotidanaloga, die an Nucleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen, enthalten z. B. Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugate.  
40 Typische interkalierende und quervernetzende Reste sind:

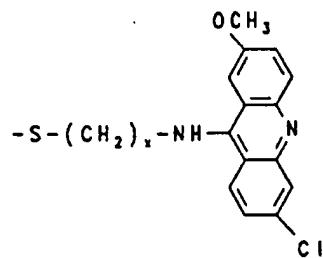
45



50

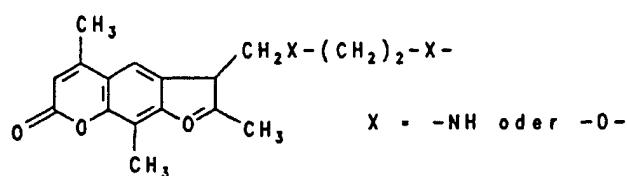
Acridinderivat x = 2-12, bevorzugt 4

55



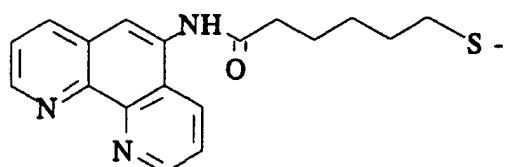
x = 2-12, bevorzugt 4

15



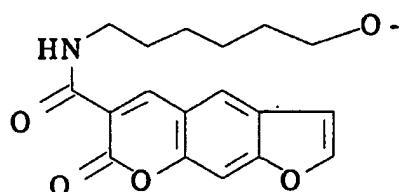
Trimethylpsoralen-konjugat (= "Psoralen" fuer X = O)

30



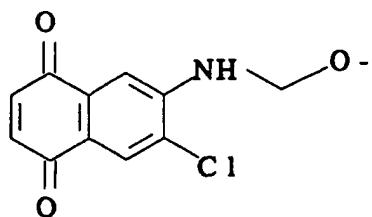
Phenanthrolinkonjugat

40



Psoralenkongjugat

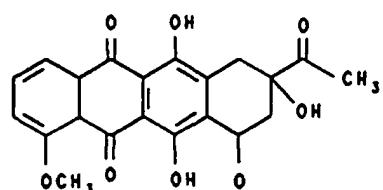
55



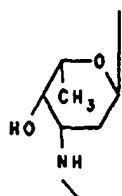
10

## Naphthochinonkonjugat

15



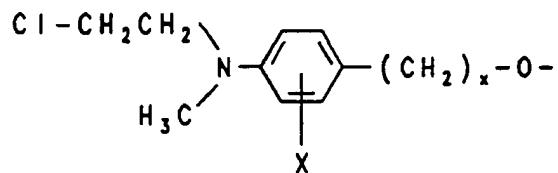
20



30

## Daunomycin derivat

35



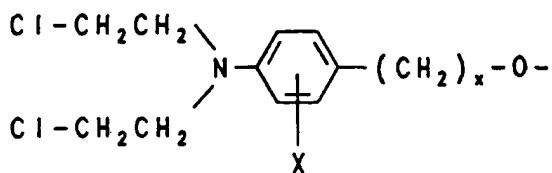
40

z = 1-18, X = Alkyl, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN, -C(=O)-R

45

50

55



10

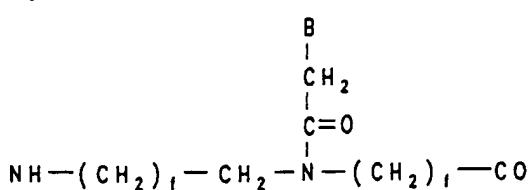


15

[0022] Beispiele für Gruppen  $\text{NR}^3\text{R}^4$ , in denen  $\text{R}^3$  und  $\text{R}^4$  zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5- bis 6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom enthält, seien der Morpholinyl- und der Imidazolidinyl-Rest genannt.

20 [0023] Der Polyamid-Teil (PNA in Formel 1a) besteht aus Amid-Strukturen, welche mindestens eine Nucleobase enthalten, die von Thymin verschieden ist. Solche Polyamid-Strukturen sind beispielsweise aus dem Baustein a), aufgebaut, worin f für 1 bis 4, bevorzugt für 1 oder 2 steht:

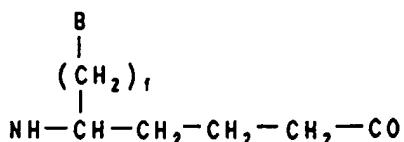
25 a)



[0024] Hyrup et al.; J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1993, 519

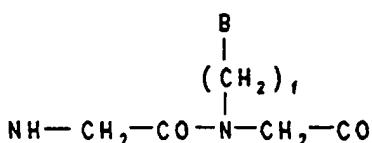
35

c)



45 [0025] Huang et al. (1991) J. Org. Chem. 56, 6007

d)

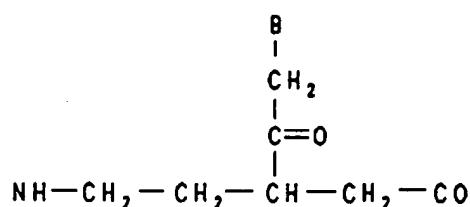


55

[0026] Almarsson et al. (1993) Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 7518

e)

5



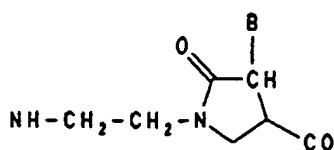
10

[0027] Froehler et al. (1991) WO 93/10820

15

f)

20



25 [0028] Froehler et al. (1991) WO 93/10820

[0029] Endgruppen für PNA's sind in den gleichzeitig eingereichten Anmeldungen mit den Titeln "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe" (EP 0 672 700 B1, DE-P 44 08 531.1) und "PNA-Synthese unter Verwendung einer basenlabilen Amino-Schutzgruppe" (EP 0 672 701 B1; DE-P 44 08 533.8) beschrieben.

30 [0030] Bevorzugt sind Polyamidstrukturen, die aus Strukturen entsprechend a) aufgebaut sind. Besonders bevorzugt sind letztere, falls f=1 ist.

[0031] Die Darstellung von Polyamid-Oligonucleotid-Derivaten der Formel Ia erfolgt ähnlich wie die Synthese von Oligonucleotiden in Lösung oder vorzugsweise an fester Phase, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme eines automatischen Synthesegeräts. Der Aufbau des Oligomers der Formel Ia kann schrittweise erfolgen, indem sukzessive eine

35 PNA-Einheit bzw. DNA-Einheit mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert werden. Der Aufbau kann aber auch fragmentweise erfolgen, wobei die Fragmente zuerst als Polyamid- bzw. Oligonucleotid-Strukturen synthetisiert werden, welche dann zum Polyamid-Oligonucleotid der Formel Ia verknüpft werden. Es können jedoch auch Bausteine aus PNA und Nucleotid eingesetzt werden, vorzugsweise Dimere, die dann nach den Methoden der Nucleotid-Chemie oder Peptid-Chemie zu Polyamid-Oligonucleotid Derivaten aufgebaut werden.

40 [0032] Der Aufbau des Oligonucleotid-Teils erfolgt nach den dem Fachmann bekannten Verfahren wie der Triester-Methode, der H-Phosphonat-Methode oder Phosphoramidit-Methode, bevorzugt nach der Standard-Phosphoramidit Chemie nach Caruthers (M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)). Die Synthese des Polyamid-Teils kann nach den dem Fachmann bekannten Methoden der Peptid-Chemie erfolgen. Falls Oligonucleotid-Teil und Polyamid-Teil nicht separat synthetisiert und nachfolgend verbunden werden, müssen die zum Aufbau der Oligonucleotid- und Polyamid-Struktur verwendeten Verfahren miteinander kompatibel sein, wobei eine bevorzugte Ausführungsform zur Synthese des Polyamid-Teils in der gleichzeitig eingereichten Anmeldung mit dem Titel "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe" (EP 0 672 700 B1, DE-P 44 08 531.1) beschrieben ist.

45 [0033] Je nachdem, ob q, r, s und t gleich 1 oder Null sind, erfolgt die Synthese beginnend mit dem Oligonucleotid- oder mit dem Polyamid-Teil. Die Synthese von Verbindungen der Formel Ia, deren Oligonucleotid-Teil am 3'- und/oder am 5'-Ende modifiziert sind, erfolgt bezüglich dieser Modifikationen nach den in EP-A 0 552 766 beschriebenen Verfahren (vgl. Syntheseschema für DNA). Die Synthese von Verbindungen der Formel Ia erfolgt bezüglich des Polyamid-

50 Teils nach dem in der gleichzeitig eingereichten Anmeldung mit dem Titel "PNA-Synthese unter Verwendung einer gegen schwache Säuren labilen Amino-Schutzgruppe" (EP 0 672 700 B1, DE-P 44 08 531.1) beschriebenen Verfahren (vgl. Syntheseschema für PNA).

Syntheseschema für DNA

[Ankergruppe]-[Polymer]

1.       ↓      Aufkupplung von PG-(Nu')-aktiv  
PG-(Nu')-[Ankergruppe]-[Polymer]
2.       ↓      Abspaltung der Schutzgruppe PG  
H-(Nu')-[Ankergruppe]-[Polymer]
3.       ↓      Wiederholung der Schritte 1 und 2 (n-1)-mal  
H-(Nu')<sub>n</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
4.       ↓      Aufkupplung von R<sup>0</sup>-V-aktiv  
R<sup>0</sup>-V-(Nu')<sub>n</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
5.       ↓      Abspaltung von Polymer und Schutzgruppen  
R<sup>0</sup>-V-(Nu)<sub>n</sub>

Syntheseschema für PNA

[Ankergruppe]-[Polymer]

1.       ↓      Aufkupplung von PG-(Q')-OH  
PG-(Q')-[Ankergruppe]-[Polymer]
2.       ↓      Abspaltung der Schutzgruppe PG  
H-(Q')-[Ankergruppe]-[Polymer]
3.       ↓      Wiederholung der Schritte 1 und 2 (l-1)-mal  
H-(Q')<sub>l</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
4.       ↓      Aufkupplung von PG-[B'/X]-OH  
PG-[B'/X]-(Q')<sub>l</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]

50

55

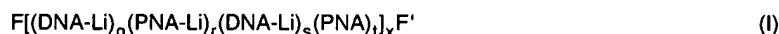
5.           ↓     Abspaltung der Schutzgruppe PG  
               H-[B'/X]-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
6.           ↓     Wiederholung der Schritte 4 und 5 (n-1)-mal  
               H-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
- 10          7.       ↓     Aufkupplung von PG-(A')-OH  
               PG-(A')-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
- 15          8.       ↓     Abspaltung der Schutzgruppe PG  
               H-(A')-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
- 20          9.       ↓     Wiederholung der Schritte 7 und 8 (k-1)-mal  
               H-(A')<sub>k</sub>-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
- 25          10.      ↓     Aufkupplung der Gruppe R<sup>0</sup>  
               R<sup>0</sup>-(A')<sub>k</sub>-[B'/X]<sub>n</sub>-(Q')<sub>i</sub>-[Ankergruppe]-[Polymer]
- 30          11.      ↓     Abspaltung von Polymer und Schutzgruppen  
               R<sup>0</sup>-(A)<sub>k</sub>-[B/X]<sub>n</sub>-(Q)-R<sup>0</sup>

Darin bedeuten:

[0034]

- 35          PG       Schutzgruppe, bevorzugt eine gegen schwache Säure labile Schutzgruppe;  
               Nu'      Nucleotid-Einheit, deren exocyclische Aminogruppe durch eine geeignete Schutzgruppe geschützt ist;  
               Nu'-aktiv   ein in der Nucleotidchemie übliches aktiviertes Derivat, wie z.B. von einem Phosphoramidit, einem  
                       Phosphordiester oder einem H-Phosphonat;  
               A', B' und Q'   stehen für die gegebenenfalls geschützten Formen von A, B und Q.

[0035] Beispieleweise ein Syntheseschema für PNA/DNA-Hybride der Formel I



45          als Vergleichsschema.

[0036] Für q=r=s=t=1 und x=1 gilt folgender Syntheseablauf:

50

55

1. ↓ Synthese der Endgruppe F'; ggf. Konjugation auf Polymer  
PG-F'
- 5 2. ↓ Abspaltung der Schutzgruppe PG  
H-F'
- 10 3. ↓ Konjugation der Polyamidstruktur  
PNA-F'
- 15 4. ↓ Aufkupplung eines Linkers  
Li-PNA-F'
5. ↓ Konjugation der Nucleotidstruktur  
DNA-Li-PNA-F'
- 20 6. ↓ Aufkupplung eines Linkers  
Li-DNA-Li-PNA-F'
- 25 7. ↓ Wiederholung der Schritte 3 bis 5  
DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F'
- 30 8. ↓ Aufkupplung der Endgruppe F  
F-DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F'

[0037] Die Aufkupplung des Linkerbausteins kann entfallen, sofern sich entsprechende Übergänge in den PNA- oder DNA-Bausteinen befinden.

[0038] Zur Verdeutlichung ist ein Syntheseschema für PNA/DNA-Hybride der Formel I gezeigt, das die Herstellung eines Hybrid-Oligomers, in dem  $q=r=s=t=1$  und  $x=1$  sind, beispielhaft erläutert. Zunächst wird die Endgruppe F nach bekannten Verfahren synthetisiert und im Falle der Festphasen-Synthese auf einen polymeren Träger gekuppelt (Schritt 1). Nach Abspaltung der Schutzgruppe PG (Schritt 2), die bevorzugt im schwach sauren Medium erfolgt, werden die Polyamid-Bausteine bis zur gewünschten Länge des PNA-Teils aufgekuppelt (Schritt 3). Als Übergang zum DNA-Teil kann nur die Anknüpfung einer Linker-Einheit (Schritt 4) erfolgen. Anschließend erfolgt die Konjugation der Nucleotidstruktur durch sukzessive Ankondensation der Nucleotid-Bausteine (Schritt 5), bevorzugt nach der bekannten Phosphoramidit-Methode. Nach Ankondensation eines Linkers (Schritt 6), der den Übergang von DNA zu PNA ermöglicht, wird wiederum eine Polyamidstruktur aufgebaut. Einführung eines Linkers, der den Übergang von PNA nach DNA ermöglicht, Konjugation einer weiteren DNA-Struktur (Schritt 7) und abschließende Aufkupplung der Endgruppe F (Schritt 8) ergeben das Hybridmolekül [F-DNA-Li-PNA-Li-DNA-Li-PNA-F']. Die Linkerbausteine können hierbei auch Nucleobasen beinhalten.

Zur Synthese eines Hybrids F-DNA-Li-PNA-Li-F' ( $q=r=1$ ,  $s=t=NULL$ ) werden beispielsweise erst die Schritte 1-5 durchgeführt und die Synthese dann mit Schritt 8 abgeschlossen.

50 Zur Synthese eines Hybrids F-PNA-Li-DNA-F' ( $r=s=1$ ,  $q=t=NULL$ ) werden beispielsweise erst die Schritte 1-2 durchgeführt, danach folgen die Schritte 5-6, gefolgt von Schritt 3 und Abschluß der Synthese mit Schritt 8.

[0039] Nach Aufbau der polymeren Ketten müssen die PNA/DNA-Hybride im Falle der Festphasensynthese vom Träger abgespalten werden und gegenüberliegende die Schutzgruppen an den Basen, Aminosäure-Seitenketten und Endgruppen abgespalten werden.

55 [0040] PNA- und DNA-Teil können aber auch getrennt nach bekannten Methoden synthetisiert und anschließend über entsprechende Aktivierung mindestens einer Komponente miteinander gekuppelt werden. Die Aktivierung des PNA-Teils erfolgt bevorzugt über die Carbonsäure-Gruppe, beispielsweise als Aktivester oder Isothiocyanat, die dann mit reaktiven Gruppen im DNA-Teil, vorzugsweise einer Aminofunktion in Reaktion gebracht werden. Die Aktivierung

des DNA-Teils erfolgt beispielsweise in Form einer an sich bekannten Bromcyan-Kondensation, bei der die aktivierte Phosphatfunktion mit einer reaktiven Gruppe im PNA-Teil, bevorzugt einer Aminofunktion zur Reaktion gebracht wird.

[0041] Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Oligomeren der Formel Ia im Vergleich zu den reinen PNA's eine stark erhöhte zelluläre Aufnahme besitzen. Diese verbesserte Zellaufnahme ist ganz entscheidend, da Antisense- oder Triplexbildende Oligomere nur dann wirken können, wenn sie effektiv in Zellen aufgenommen werden. Ihr Hybridisationsverhalten ist ebenfalls günstiger als bei reinen PNA's, da sie bevorzugt zur antiparallelen Duplexbildung führen. Im Vergleich zu normalen Oligonucleotiden besitzen sie eine verbesserte Nucleasestabilität, was sich in einer erhöhten biologischen Aktivität äußert. Die Bindungsaffinität an komplementäre Nucleinsäuren ist besser als die anderer nucleasestabiler Oligonucleotide, wie z.B. Phosphorothioate oder Methylphosphonate. Die Bindungsaffinität der erfindungsgemäßen Verbindungen ist beim Vergleich mit natürlichen Oligonucleotiden, die unter Serum-Bedingungen rasch abgebaut werden, mindestens gleich gut oder meistens jedoch besser. Die Erhöhung der Bindungsaffinität ist abhängig von der Länge des PNA-Teils. Reine PNA's zeigten in den Zellkulturversuchen bei Konzentrationen von > 5 µM stark cytotoxische Wirkung, während die erfindungsgemäßen Verbindungen die Zellen nicht schädigten. Es wurde ferner gefunden, daß Verbindungen der Formel Ia in Abhängigkeit von der Basenfolge des PNA- und DNA-Teils die Expression spezifischer Gene, beispielsweise von Enzymen, Rezeptoren oder Wachstumsfaktoren in Zellkultur und in ausgewählten Beispielen im Tiermodell hemmen.

[0042] Weitere Vorteile der PNA/DNA-Oligomeren bzw. PNA/RNA-Oligomeren bestehen in der Möglichkeit der Stimulierung zellulärer Endonukleasen wie beispielsweise RNase H und RNase L. Im Gegensatz zu PNA's können die erfindungsgemäßen PNA-DNA-Chimären, die einige Desoxyribonucleotid-Einheiten aufweisen, nach Anbindung an die komplementäre Target-RNA diese in sequenzspezifischer Weise durch Induktion der zellulären RNase H spalten. Eine besondere Ausführungsform der erfindungsgemäßen Oligomeren sind weiterhin solche, die aus PNA- und einem 2'5'-verknüpften Oligoadenylat-Teil, vorzugsweise Tetraadenylat oder dessen Cordycepin-Analogon aufgebaut sind, und die die zelluläre RNase L aktivieren.

[0043] Ganz generell erstreckt sich die vorliegende Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel Ia als therapeutisch wirksame Bestandteile eines Arzneimittels. Als therapeutisch wirksame Polyamid-Oligonucleotid-Derivate versteht man im allgemeinen Antisense Oligonucleotide, Tripelhelix-bildende-Oligonucleotide, Aptamere oder Ribozyme, insbesondere Antisense-Oligonucleotide.

[0044] Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden.

[0045] Erfindungsgemäße Antisense Polyamid-Oligonucleotide-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basensequenz. Die Länge und Position des PNA- und DNA-Teils kann in diesen Sequenzen zur Erzielung optimaler Eigenschaften entsprechend variiert werden.

35 a) gegen HIV, z. B.

5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G -3'

(I)

oder

45

5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3'

(II)

50 oder

5'-G T C G A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G A T A A-3'

(III)

oder

5' - G C T A T G T C G A C A C C C A A T T C T G A A A - 3'

5  
(IV)

oder

10  
5' - T C G T C G C T G T C T C C G C T T C T T C C T G C C A  
(VI)

15  
oder

b) gegen HSV-1, z.B.

20  
5' - G C G G G G C T C C A T G G G G T C G - 3'  
(VII)

25  
[0046] Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs. Beispielsweise können dabei Polyamid-Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

- 30 1) Nukleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120  
2) Cytoplasmatische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl  
35 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EGF-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms  
4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin,

40 [0047] Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

45  
5' - C A G C T G C A A C C C A G C - 3'  
(VIII)

50 b) bFGF, z.B.

55  
5' - G G C T G C C A T G G T C C C - 3'  
(XXX)

c) c-myc, z.B.

5'- G G C T G C T G G A G C G G G G C A C A C -3'  
(IX)

5

10

5'-A A C G T T G A G G G G C A T -3'  
(X)

15

20

5'-G T G C C G G G G T C T T C G G G C -3'  
(XI)

d) c-myb, z.B.

15

e) c-fos, z.B.

25

5'-G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G -3'  
(XII)

30

35

5'-C C C G A G A A C A T C A T G G T C G A A G -3'  
(XIII)

40

5'-G G G G A A A G C C C G G C A A G G G G -3'  
(XIV)

f) p120, z.B.

45

5'-C A C C C G C C T T G G C C T C C C A C -3'  
(XV)

50

g) EGF-Rezeptor, z.B.

55

5'-G G G A C T C C G G C G C A G C G C -3'  
(XVI)

5' - G G C A A A C T T T C T T T C C T C C - 3'  
(XVII)

5

h) p53 Tumorsuppressor, z.B.

10

5' - G G G A A G G A G G A G G A T G A G G - 3'  
(XVIII)

15

5' - G G C A G T C A T C C A G C T T C G G A G - 3'  
(XIX)

20

[0048] Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflußt werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM oder ELAM.

25

[0049] Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotid-Derivate, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) VLA-4, z.B.

30

5' - G C A G T A A G C A T C C A T A T C - 3'  
(XX)

oder

35

b) ICAM, z.B.

40

5' - C C C C A C C A C T T C C C T C T C - 3'  
(XXI)

45

5' - C T C C C C A C C A C T T C C C T C - 3'  
(XXII)

50

5' - G C T G G G A G C C A T A G C G A G G - 3'  
(XXIII)

c) ELAM-1, z. B.

55

5' - A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G - 3'  
(XXIV)

5' - C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C - 3'

(XXV)

5

[0050] Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Verhinderung der Restenosie. Beispielsweise können dabei Polyamid-Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Proliferation oder Migration verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise:

1) Nukleare Transaktivator-Proteine und Cycline wie beispielsweise c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, Cycline und cdc2-Kinase

15

2) Mitogene oder Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF und TGF- $\beta$ .

3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise bFGF-Rezeptor, EGF-Rezeptor und PDGF-Rezeptor.

20

[0051] Erfindungsgemäße Antisense-Polyamid-Oligonucleotide der Formel I, die gegen solche Targets wirksam sind, haben beispielsweise folgende Basen-Sequenz:

a) c-myb

25

5' - G T G T C G G G G T C T C C C G G G C - 3'

(XXVI)

30

b) c-myc

5' - C A C G T T G A G G G G C A T - 3'

(XXVII)

35

c) cdc2-Kinase

40

5' - G T C T T C C A T A G T T A C T C A - 3'

(XXVIII)

d) PCNA (proliferating cell nuclear antigen of rat)

45

5' - G A T C A G G C G T G C C T C A A A - 3'

(XXIX)

50

[0052] Die Arzneimittel können z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z.B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatinekapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Der Einschluß der Arzneimittel in Liposomen, die gegebenenfalls weitere Komponenten wie Proteine enthalten, ist eine ebenfalls geeignete Applikationsform. Sie können auch rektal z.B. in Form von Suppositorien oder parenteral z.B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatinekapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talk und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind

Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbfüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

**[0053]** Bevorzugte Verabreichungsformen sind topische Applikationen, lokale Applikationen wie beispielsweise mit Hilfe eines Katheters oder aber auch Injektionen. Zur Injektion werden die Antisense-Polyamid-Oligonucleotid-Derivate in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z.B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Antisense-Polyamid-Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden. Die für die systemische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

**[0054]** Ganz generell erstreckt sich die Erfindung auf die Verwendung von Verbindungen der Formel I als DNA-Sonden oder Primer in der DNA-Diagnostik, insbesondere im Sinne der in EP-A 0 602 524 genannten Gensonden, und allgemein als Hilfsmittel in der Molekularbiologie.

**[0055]** In der DNA-Diagnostik spielen Gensonden, auch DNA-Probes oder Hybridization-Probes genannt, eine große Rolle zum sequenzspezifischen Nachweis bestimmter Gene. Eine Gensonde besteht im allgemeinen aus einer Erkennungssequenz und einer geeigneten Markierungsgruppe (Label). Die Spezifität der Bestimmung einer Targetsequenz in einer Analysenprobe mittels Hybridisierung mit einer komplementären Gensonde wird durch die Erkennungssequenz und deren chemischer Struktur determiniert. Die PNA's haben gegenüber den Oligonucleotiden natürlicher Struktur den Vorteil, daß sie eine höhere Affinität zur Targetsequenz besitzen. Jedoch ist die Spezifität der Hybridisierung reduziert, da PNA's im Gegensatz zu natürlicher DNA sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Orientierung an einzelsträngige Nucleinsäuren binden können. Die erfindungsgemäßen PNA/DNA-Oligomeren zeigen ebenfalls eine erhöhte Bindungsaffinität, binden jedoch stark bevorzugt in der gewünschten antiparallelen Orientierung.

**[0056]** Durch entsprechende Auswahl des PNA- bzw. DNA-Teils in einer Gensonde kann zudem das Differenzierungsvermögen positiv beeinflußt werden, da eine Basenpaarung im PNA-Teil zu einer stärkeren Depression der Schmelztemperatur eines Hybrids führt als eine Basenpaarung im DNA-Teil. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die Differenzierung bei Punktmutationen wie sie beispielsweise beim Übergang von Protoonkogenen in die entsprechenden Onkogene (pathogener Zustand) vorkommen. Der Vorteil der besseren Diskriminierung zwischen pathogenem und nichtpathogenem Zustand läßt sich auch in Form der Primer-Eigenschaft der erfindungsgemäßen PNA/DNA-Oligomeren nutzen, sofern diese eine freie 3'-Hydroxyfunktion im DNA-Teil besitzen. PNA's als solche besitzen keine Primer-Funktion für Polymerasen. Überraschenderweise wurde gefunden, daß bereits eine Nucleosid-Einheit am Ende eines PNA/DNA-Oligomers ausreicht, um die DNA-Polymerasereaktion, beispielsweise mit Hilfe der DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) zu initiieren. Je nach Beschaffenheit des PNA/DNA-Primers und der Art des Templatzes, an welches der Primer in sequenzspezifischer Weise hybridisiert, können verschiedene Polymerasen eingesetzt werden. Diese sind im allgemeinen kommerziell zugänglich, wie beispielsweise Taq-Polymerase, Klenow-Polymerase oder Reverse Transkriptase.

**[0057]** Ein weiterer Vorteil gegenüber der Verwendung natürlicher Oligonucleotid-Primer besteht darin, daß der mit Hilfe des PNA/DNA-Primers kopierte Nucleinsäurestrang, der den PNA-Teil am 5'-Ende enthält, gegen 5'-Exonuclease stabil ist. Somit können alle natürlichen DNA- bzw. RNA-Sequenzen im Reaktionsgemisch durch 5'Exonuclease abgebaut werden, ohne daß der PNA-haltige Strang angegriffen wird.

**[0058]** Ein weiterer Vorteil der PNA/DNA-Oligomeren besteht darin, daß man damit auch andere biochemische Reaktionen am DNA-Teil durchführen kann, welche bei PNA's selbst nicht möglich sind. Beispiele für solche Reaktionen sind das "3'-Tailing" mit 3'-terminaler Transferase, der Restriktionsenzymverdau im DNA-Doppelstrang-Bereich sowie Ligase-Reaktionen. Beispielsweise kann ein (PNA)-(DNA)-OH Oligomer mit freier 3'-Hydroxygruppe mit einem zweiten p-(DNA)-(PNA)-Oligomer, das am 5'-Ende ein Nucleosid-5'-Phosphat enthält, nach Hybridisierung an eine komplementäre DNA-Hilfssequenz natürlichen Ursprungs in Gegenwart einer DNA-Ligase verknüpft werden.

**[0059]** Weiterhin lassen sich (DNA)-(PNA)-(DNA) Oligomere in Gene einbauen, was mit PNA's zur Zeit nicht möglich ist.

**[0060]** Die Anknüpfung von Markierungsgruppen an PNA/DNA-Oligomere erfolgt nach an sich bekannten Methoden, wie sie für Oligonucleotide oder Peptide beschrieben sind. Die Art der Markierungsgruppe kann breit variiert werden und richtet sich im wesentlichen nach der Art des verwendeten Assays. Bekannte Ausführungsformen von Gensonden-Assays sind "Hybridization Protection"-, "Energy-Transfer"- und "Kissing Probes"-Assay. PNA/DNA-Oligomere eignen sich zudem besonders gut für einen "Strand Displacement"-Assay. In vielen Fällen ist die Abtrennung des gebildeten Hybrids von überschüssiger Gensonde mit Hilfe von Magnetpartikeln von Vorteil. Die Stabilität der erfindungsgemäßen PNA/DNA-Gensonden ist höher als die herkömmlicher DNA-Sonden.

**[0061]** "Polymerase Chain Reaction" (PCR) und "Ligase Chain Reaction" (LCR) sind Techniken zur Targetamplifikation, in welche die erfindungsgemäßen Oligomeren ebenfalls als Primer eingesetzt werden können. Besonders vor-

teilhaft lassen sich die PNA/DNA-Oligomeren als Gensonden nach dem "Christmas tree"-Prinzip verwenden, da hierbei die PNA/DNA-Sonden kürzer sein können als entsprechende DNA-Sonden.

**Beispiele:**

5

[0062] Die für Aminosäuren verwendeten Abkürzungen entsprechen dem in der Peptidchemie üblichen drei Buchstaben-Code wie er in Europ. J. Biochem. 138, 9 (1984) beschrieben ist. Weitere verwendete Abkürzungen sind nachfolgend aufgelistet.

10	Aeg Aeg(aMeOBz) Aeg(cBz) Aeg(cMeOBz) Aeg(cBuBz) Aeg(gBu) Aeg(g <sup>2</sup> -Ac,4-Dpc) Aeg(t) Bnpeoc	N-(2-Aminoethyl)glycyl, -NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO- N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>6</sup> -4-methoxybenzoyl)adenosyl)acetyl)-glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -benzoyl)-cytosyl)acetyl)-glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -4-methoxybenzoyl)cytosyl) acetyl)-glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((1-(N <sup>4</sup> -4-tert.butylbenzoyl)cytosyl)acetyl)-glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>2</sup> -isobutanoyl)-guanosyl)acetyl)glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((9-(N <sup>2</sup> -acetyl-O <sup>4</sup> -diphenylcarbamoyl)guanosyl)glycyl N-(2-Aminoethyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl 2,2-[Bis(4-nitrophenyl)]-ethoxycarbonyl
15	Bnpeoc Boc BOI BOP BroP BSA	tert.-Butyloxycarbonyl 2-(Benzotriazol-1-yl)oxy-1,3-dimethyl-imidazolidinium-hexafluorophosphat Benzotriazolyl-1-oxy-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat Brom-tris(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid
20	But Bz Bzl Cl-Z CPG	tert.-Butyl Benzoyl Benzyl 4-Chlor-benzyloxycarbonyl Controlled Pore Glas
25	DBU DCM Ddz DMF	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en Dichlormethan 3,5-Dimethoxyphenyl-2-propyl-2-oxy carbonyl Dimethylformamid
30	Dmt Dnpeoc Dpc FAM	Di-(4-methoxyphenyl)phenylmethyl, 2-(2,4-Dinitrophenyl)-ethoxycarbonyl Diphenylcarbamoyl Fluorescein-Rest
35	Fm Fmoc H-Aeg-OH HAPyU HATU	9-Fluorenylmethyl 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl N-(2-Aminoethyl)glycin O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(tetramethylen)uronium-hexafluorophosphat
40	HBTU HOEt HONSu HOOEt iBu MeOBz Mmt Moz MSNT	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat 1-Hydroxybenzotriazol N-Hydroxysuccinimid 3-Hydroxy-4-oxo-3,4- dihydrobenzotriazin Isobutanoyl 4-Methoxybenzoyl
45	Mtt NBA NMP	4-Methoxytriphenylmethyl 4-Methoxybenzyloxycarbonyl 2,4,6-Mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid 4-Methylphenyl)diphenylmethyl Nitrobenzylalkohol N-Methylpyrrolidin
50		
55		

(fortgesetzt)

	Obg	N-(4-Oxybutyl)glycyl, -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
5	Obg(t)	N-(4-Oxybutyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl
	Oeg	N-(2-Oxyethyl)glycyl, -O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
	Oeg(t)	N-(2-Oxyethyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl
10	Opeg	N-(5-Oxypentyl)glycyl, -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
	Opeg(t)	N-(5-Oxypentyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl
	Oprg	N-(3-Oxypropyl)glycyl, -O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
15	Oprg(t)	N-(3-Oxypropyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl
	Pixyl	9-(9-Phenyl)xanthenyl
	PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
	PyBroP	Brom-tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
20	TAPipU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-bis(pentamethylen)uronium-tetrafluoroborat
	TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat
	tBu	tert.-Butyl
	tBuBz	4-tert.Butylbenzoyl
25	TDBTU	O-(3,4-Dihydro-4-oxo-1,2,3-benzotriazin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TDO	2,5-Diphenyl-2,3-dihydro-3-oxo-4-hydroxythiophendioxid
	Teg	N-(2-Thioethyl)glycyl, -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -NH-CH <sub>2</sub> -CO-
	Teg(t)	N-(2-Thioethyl)-N-((1-thyminyl)acetyl)-glycyl
30	TFA	Trifluoressigsäure
	THF	Tetrahydrofuran
	TNTU	O-[(5-Norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TOTU	O-[(Cyano(ethoxycarbonyl)methylen)amino]-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	TPTU	O-(1,2-Dihydro-2-oxo-1-pyridyl)-1,1,3,3'-tetramethyluronium tetrafluoroborat
35	Trt	Trityl
	TSTU	O-(N-Succinimidyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
	Z	Benzyloxycarbonyl
	MS(ES <sup>+</sup> )	Elektrospray Massenspektrum (Positiv Ion)
	MS(ES <sup>-</sup> )	Elektrospray Massenspektrum (Negativ Ion)
40	MS(DCI)	Desorption Chemical Ionisation Massenspektrum
	MS(FAB)	East-Atom-Bombardment-Massenspektrum

## Beispiel 1

40 1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexan Mmt-hex

[0063] 6-Aminohexan-1-ol (1g; 8.55mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (7ml) gelöst und mit Triethylamin (0.2ml) versetzt. Zu dieser Lösung gibt man innerhalb von 45 Minuten eine Lösung von (4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylchlorid (2.5g; 8.12mmol) in wasserfreiem Pyridin (9ml). Die Reaktionslösung wird 30 Minuten bei 22°C weitergerührt und durch Zugabe von Methanol (3ml) gestoppt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt, der erhaltene Rückstand zur Entfernung des Pyridins dreimal mit Toluol koevaporiert. Der erhaltene Rückstand wird in Ethylacetat gelöst und diese Lösung nacheinander mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung, mit Wasser und einer gesättigten Kaliumchloridlösung gewaschen. Die organische Phase wird getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und im Vakuum konzentriert. Das Rohprodukt wird durch Kieselgelchromatographie mit Heptan:Ethylacetat:Triethylamin/49.5:49.5:1 gereinigt. Ausbeute: 1.64g  
 MS (FAB,NBA/LiCl) 396.3 ( $\text{M}+\text{Li}$ )<sup>+</sup>, 390.3 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>, 273.2 (Mmt)<sup>+</sup>  $R_f$  0.44 (Heptan:Ethylacetat = 1:1),

## Beispiel 2

55 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat Mmt-hex-succ

[0064] 1-Hydroxy-6-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hexan (1.00g; 2.57mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (10ml) gelöst. Zu dieser Lösung gibt man Bernsteinsäureanhydrid (0.257g; 2.57mmol) und 4-Dimethylaminopyridin

(31.3mg; 0.257mmol). Nach 3 Stunden Rühren bei 22°C gibt man weiteres Bernsteinsäureanhydrid (25.7mg; 0.257mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (62.6mg; 0.56mmol) zu und erwärmt diese Lösung 6 Stunden lang auf 50°C. Nach weiteren 16 Stunden bei 22°C wird eingeengt, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und die erhaltene Lösung mit eiskalter 5%-iger wässriger Zitronensäure gewaschen. Nach Trocknen der org. Phase ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt. Die Reinigung des Rückstands durch Kieselgelchromatographie mit 50%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /1% Triethylamin in Ethylacetat und dann mit 5% Methanol/1% Triethylamin in Dichlormethan ergibt die gewünschte Verbindung als farbloses Öl.

MS (ES): 978.0 (2M-H)<sup>-</sup>; 488.3 (M-H)<sup>-</sup>  
 $R_f$  0.30 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EthylAcetat = 1:1).

10

**Beispiel 3**

6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamido-Tentagel (Mmt-hex-succ-Tentagel)

15 [0065] Die Aminoform von Tentagel<sup>R</sup> (Rapp Polymere) (0.5g; 0.11mmol Aminogruppen) lässt man 10 Minuten in 4-Ethylmorpholin (0.1ml) und DMF (5ml) quellen. Dann gibt man eine Lösung von 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (97.4mg; 0.165mmol), 4-Ethylmorpholin (15.9mg; 0.138mmol; 17.4ml) und TBTU (52.9mg; 0.165mmol) in DMF (3ml) zu und schüttelt die Suspension 16 Stunden lang bei 22°C. Der derivatisierte Tentagel-Träger wird abfiltriert und nacheinander mit DMF (3x3ml),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3x1ml) und Diethylether (3x1ml) gewaschen und getrocknet. Nicht reagierte Aminofunktionen werden durch 1-stündige Behandlung mit Acetanhydrid/Lutidin/1-methyimidazol in THF (1ml) blockiert. Der fertige Träger wird mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3x1ml) und Diethylether (3x1ml) gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung bezogen auf die eingeführte Monomethoxytritylfunktion beträgt 168mmolg<sup>-1</sup>.

20

**Beispiel 4**

25

6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl succinylamidopropyl-Controlled-pore glass.

(Mmt-hex-succ-CPG)

30

[0066] Die Herstellung erfolgt analog wie in Beispiel 3 beschrieben ausgehend von Aminopropyl-CPG (Firma Fluka) (550Å; 1.0g;) und 6-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)-hex-1-yl hemisuccinat (48.7mg; 0.082mmol), 4-Ethylmorpholin (7.6ml) und TBTU (26.4mg; 0.082mmol) in DMF (3ml). Die Beladung des Mmt-hex-succCPG beträgt 91mmolg<sup>-1</sup>.

35

**Beispiel 5**

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-(N<sup>4</sup>-(4-tertbutylbenzoyl)-cytosyl)acetyl) glycine

(Mmt-Aeg(C<sup>t</sup>BuBz)-OH)

40

[0067] 1.63 g (2.28 mMol) N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-(N<sup>4</sup>-(4-tert-butylbenzoyl)-cytosyl)acetyl) glycine-methylester wurden in einer Mischung aus 10 ml Dioxan und 1 ml Wasser gelöst und bei 0°C unter Röhren tropfenweise mit 4.56 ml 1N NaOH versetzt. Nach 2h wurde durch tropfenweise Zugabe von 1N  $\text{KHSO}_4$  der pH auf 5 gestellt, von ausgefallenen Salzen abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum eingedampft und der Rückstand zweimal mit Methanol und Dichlormethan koevaporiert. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel mit einem Gradienten von 2-10% Methanol und 1 % Triethylamin in Dichlormethan chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Durch Koevaporation mit Pyridin und anschließend Toluol wurde noch vorhandenes überschüssiges Triethylamin entfernt. Man erhielt 0.831 g Produkt als fast weißen Schaum. Electrospray MS (Negativ-Ion) 700.7 (M-H)<sup>-</sup>.  
 $R_f$  0.28 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH/9:1), 0.63 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH/7:3).

50

**Beispiel 6**

55

N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-((1-thyminyl)acetyl) glycine (Mmt-Aeg(t))-OH.

[0068] Das Produkt aus der obigen Reaktion wurde in einer Mischung aus 10 ml Dioxan und 2 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C gekühlt und tropfenweise 1 N Natronlauge zugegeben bis ein pH-Wert von 11 erreicht war. Nach 2 h Reaktionszeit war die Reaktion beendet und die Lösung wurde durch vorsichtige Zugabe von 2 N  $\text{KHSPO}_4$

Lösung auf pH 5 gestellt. Die Lösung wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde an Kieselgel mit einem Gradienten von 5-10% Methanol und 1 % Triethylamin in Dichlormethan chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Durch Koevaporation mit Pyridin und anschließend Toluol wurde noch vorhandenes überschüssiges Triethylamin entfernt. Man erhielt 1.065 g Produkt als farblosen Schaum. Elektrospray MS (Negativ-Ion) 1112.0 (2M-H)<sup>-</sup>, 555.3 (M-H)<sup>-</sup> R<sub>f</sub> 0.28 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH/8:2)

#### Beispiel 7

10 N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N<sup>2</sup>-(isobutanoyl)-guanosyl)acetyl)glycin  
 (Mmt-Aeg(g<sup>t</sup>Bu)-OH)

15 [0069] N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N<sup>2</sup>-(isobutanoyl)-guanosyl)acetyl)glycinmethylester (1.15g; 1.72mmol) wird in Dioxan (10ml) gelöst und über einen Zeitraum von 2.5h bei 0°C tropfenweise mit 1M wäßriger Natronlauge (10.32ml) in 5 Teilen versetzt. Nach weiteren 2h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird die Lösung durch tropfenweise Zugabe von 2M wäßriger Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH5 gestellt. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen.  
 20 Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand je zweimal mit Ethanol sowie Dichlormethan:Methanol 1/1 koevaporiert. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel durch Elution mit einem Gradienten von 10-20% Methanol in Dichlormethan (mit 1 % Triethylamin). Man erhält das Produkt als weißen Schaum.  
 Ausbeute: 1.229g  
 ESMS (Negative-Ion): 650.3(M-H)<sup>-</sup>  
 25 R<sub>f</sub> 0.25 (Dichlormethan:Methanol/8:2)

#### Beispiel 8

30 N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N<sup>6</sup>-(4-methoxybenzoyl)-adenosyl)acetyl) glycin  
 (Mmt-Aeg(a<sup>t</sup>MeOBz)-OH)

35 [0070] N-((4-methoxyphenyl)-diphenylmethylamino)ethyl-N-(9-(N<sup>6</sup>-(4-methoxybenzoyl)-adenosyl)acetyl) glycinmethylester (1.70g; 2.38mmol) wird in Dioxan (10ml) gelöst und über einen Zeitraum von 2.5h bei 0°C tropfenweise mit 1M wäßriger Natronlauge (10.32ml) in 5 Teilen versetzt. Nach weiteren 2h Reaktionszeit bei Raumtemperatur wird die Lösung durch tropfenweise Zugabe von 2M wäßriger Kaliumhydrogensulfatlösung auf pH5 gestellt. Die ausgefallenen Salze werden abfiltriert und mit wenig Dioxan nachgewaschen.  
 40 Die vereinigten Filtrate werden im Vakuum zur Trockene eingedampft und der Rückstand je zweimal mit Ethanol sowie Dichlormethan:Methanol 1/1 koevaporiert. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel durch Elution mit einem Gradienten von 10-20% Methanol in Dichlormethan (mit 1 % Triethylamin). Man erhält das Produkt als weißen Schaum.  
 Ausbeute: 1.619g  
 ESMS (Negative-Ion): 698.3(M-H)<sup>-</sup>  
 45 R<sub>f</sub> 0.10 (Dichlormethan:Methanol/8:2)

#### Beispiel 9

50 N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyloxy)ethyl-N-((1-thyminyl)acetyl) glycin  
 (Mmt-Oeg(t)-OH)

55 [0071] 0.5g (1.28mMol) N-((4-Methoxyphenyl)-diphenylmethyloxy)ethylglycin wurden in 10 ml DMF suspendiert und 0.47 ml (1.92 mMol) BSA wurden tropfenweise zugegeben. Nacheinander wurden dann 0.7 ml (5.1 mMol) Triethylamin und 0.26 g (1.28 mMol) Chlorcarboxymethylthymin zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Raumtemperatur gerührt, dann weitere 65 mg (0.32 mMol) Chlorcarboxymethylthymin zugegeben und noch für 16 h gerührt. Danach zog man das Lösungsmittel im Vakuum ab und reinigte das Rohprodukt an einer Kieselgelsäule mit einem Gradienten von 5-15% Methanol und 1 % Triethylamin in Dichlormethan. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum eingeengt. Das erhaltene bräunliche Öl wurde in wenig Dichlormethan gelöst und durch Zugabe von

## EP 0 672 677 B1

Diethylether das Produkt ausgefällt. Man erhält das Produkt als fast weißes Pulver.

Ausbeute: 0.219 g

Electrospray MS (Negativ Ion) 556.3 (M-H)<sup>-</sup>

R<sub>f</sub> 0.54 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH/8:2).

5

### Beispiel 10

4-Nitrophenyl 4-(4, 4'-Dimethoxytrityloxy)-butyrat.

10 Dmt-but-NPE

[0072] Das Natriumsalz der 4-Hydroxybuttersäure (1.26g; 10mmol) wird in wasserfreiem Pyridin (30ml) gelöst und mit 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (3.39g; 3.05mmol) versetzt. Nach 16 Stunden gibt man 4-Nitrophenol (1.39g; 10mmol) und N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (2.06g; 10mmol) zu und röhrt bei 22°C für weitere 48 Stunden. Der abgeschiedene Rückstand zweimal mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wird über eine Kieselgelsäule gereinigt (10-50% Ethylacetat und 1% Triethylamin in Petrolether). Die gewünschte Verbindung fällt in Form eines schwach gelblich gefärbten Öls an. Ausbeute 2.694g.

MS (FAB, MeOH/NBA/LiCl) 534.2 (M+Li)<sup>+</sup>; 527.2 M<sup>+</sup>.

20 R<sub>f</sub> 0.34 (Petrolether:Ethylacetate = 75:25).

### Beispiel 11

H-Oprg(t)-OH

25

[0073] 3.68 g Thyminylessigsäure werden in 20 ml trockenem DMF gelöst und 6.65 g TOTU und 2.77 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 5.32 g (3-Hydroxypropyl)-glycin, 20 ml Wasser, 20 ml DMF und 5.54 ml Triethylamin zugetropft. Man röhrt noch 1 h bei Raumtemperatur nach und engt dann am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird mit 250 ml Ethanol versetzt und das dabei ausgefallenen Natriumchlorid abgesaugt. Das Filtrat wird eingeengt und das Rohprodukt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1 % Triethylamin gefolgt von Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:4:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt. Ausbeute: 3.2 g

R<sub>f</sub> 0.15 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS(ES<sup>+</sup>): 300.2(M+H)<sup>+</sup>.

40

### Beispiel 12

Dmt-Oprg(t)-OH

45

[0074] 3.2 g H-Oprg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 5.93 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0°C eine Lösung von 7.25 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 20 min zugetropft. Man röhrt noch 2 h bei Raumtemperatur nach, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 3.46 g

R<sub>f</sub> 0,28 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)

MS(ES<sup>+</sup>) 602.4(M+H)<sup>+</sup>.

55

## Beispiel 13

## H-Obg(t)-OH

- 5 [0075] 2.76 g Thymylessigsäure werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und 4.92 g TOTU und 2.08 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 4.41 g (4-Hydroxybutyl)-glycin, 10 ml Wasser, 10 ml DMF und 4.16 ml Triethylamin zugetropft. Man röhrt noch 3 h bei Raumtemperatur nach und engt das Gemisch am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.
- 10 Ausbeute: 3.7 g
- 15 R<sub>f</sub> 0.11 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)  
MS(ES<sup>+</sup>) 314.2(M+H)<sup>+</sup>.

## Beispiel 14

## Dmt-Obg(t)-OH

- 20 [0076] 3.6 g H-Obg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 9.5 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0°C eine Lösung von 15.4 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 15 min zugetropft. Man röhrt noch 2 h bei Raumtemperatur nach gibt weitere 40 ml Dichlormethan hinzu, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das 25 Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 15:1:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.
- 30 Ausbeute: 3.45 g  
R<sub>f</sub> 0.29 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)  
MS(ES<sup>+</sup> + LiCl) 622.3(M+Li)<sup>+</sup>.

## Beispiel 15

## H-Opeg(t)-OH

- 35 [0077] 2.76 g Thymylessigsäure werden in 15 ml trockenem DMF gelöst und 4.92 g TOTU und 2.08 ml Triethylamin zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Raumtemperatur nachgerührt und dann langsam zu einer Lösung bestehend aus 4.83 g (5-Hydroxypentyl)-glycin, 10 ml Wasser, 10 ml DMF und 4.16 ml Triethylamin zugetropft. Man röhrt noch 3 h bei Raumtemperatur nach und engt das Gemisch am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, mit 1 N Salzsäure auf pH 1.5 gestellt und mit Ethylacetat extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung auf pH 5 gestellt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wird an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/Ethylacetat 10:2:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin chromatographisch gereinigt. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.
- 40 Ausbeute: 3.34 g  
R<sub>f</sub> 0.19 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin)  
MS(DCl) 328.2(M+H)<sup>+</sup>.

## 50 Beispiel 16

## Dmt-Opeg(t)-OH

- 55 [0078] 3.2 g H-Opeg(t)-OH werden in 40 ml DMF gelöst, 6.77 ml Triethylamin hinzugegeben und bei 0°C eine Lösung von 9.94 g Dmt-Cl in 40 ml Dichlormethan innerhalb von 15 min zugetropft. Man röhrt noch 2 h bei Raumtemperatur nach gibt weitere 40 ml Dichlormethan hinzu, filtriert dann das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid ab und engt das Filtrat am Rotationsverdampfer im Vakuum ein. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, mit

Wasser extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 15:1:1 unter Zusatz von 1% Triethylamin. Die das Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und am Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.

5 Ausbeute: 3.6 g

R<sub>f</sub> 0,27 (Dichlormethan/Methanol/ Ethylacetat 10:2:1 + 1% Triethylamin) MS(ES<sup>+</sup> + LiCl): 636.4(M+Li)<sup>+</sup>.

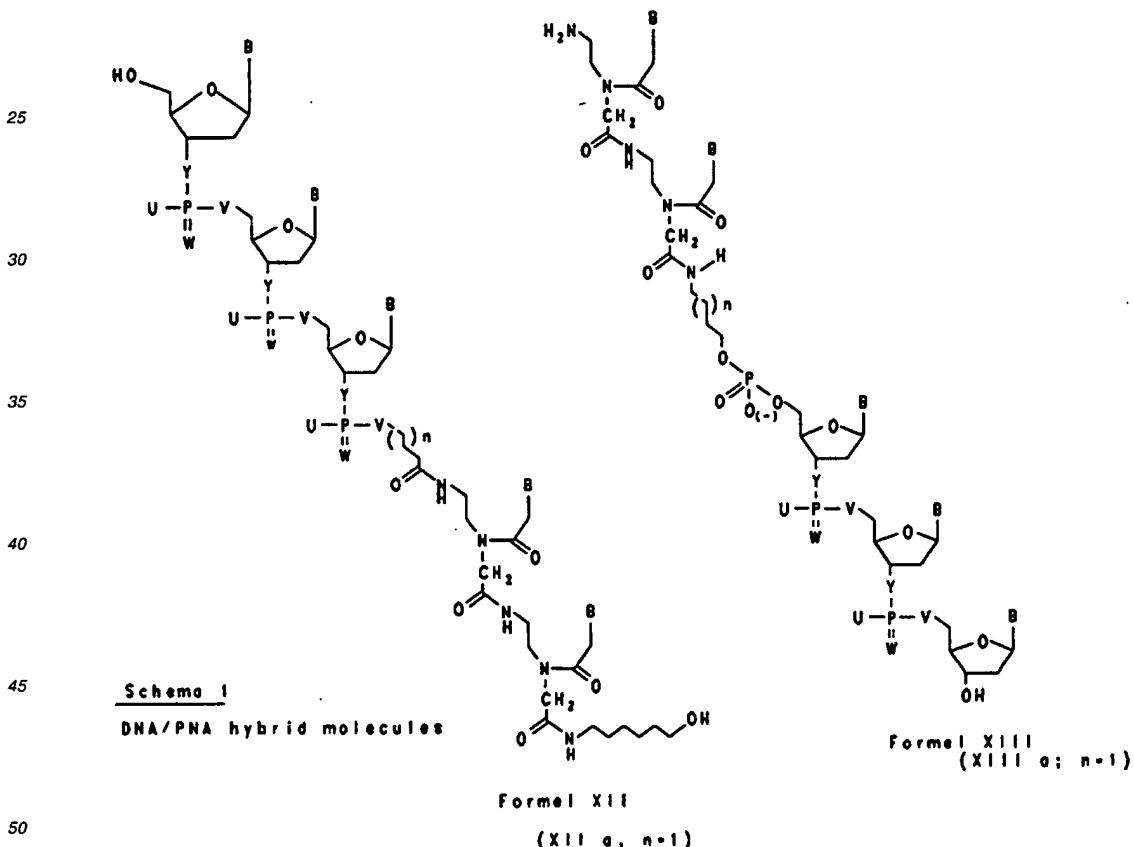
Beispiel 17

10 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agt-c-hex

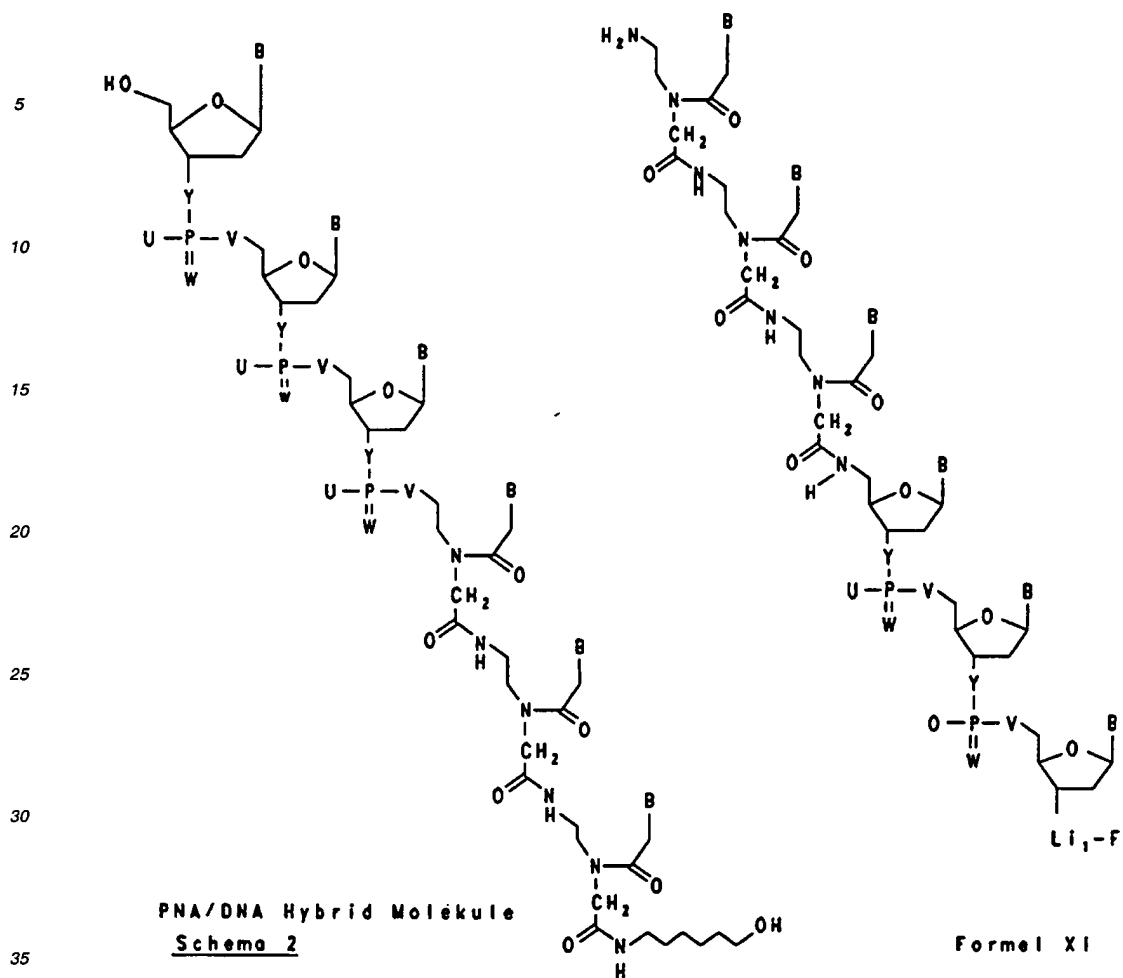
[0079] Die DNA-Sequenz ist in Großbuchstaben, die PNA-Sequenz in Kleinbuchstaben angezeigt (Beispiel für den Strukturtyp XIIa in Schema 1).

15 Die Synthese der PNA's erfolgt beispielsweise an einem Ecosyn D-300 DNA Synthesizer (Fa. Eppendorf/Biotronik, Maintal) oder einem ABI 380B DNA Synthesizer (Fa. Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Synthese des DNA-Teils wird im Prinzip nach der Standard Phosphoramidit-Chemie und den kommerziell erhältlichen Syntheseketten durchgeführt. Zur Synthese des PNA-Teils werden die Methoden der Peptid-Synthese, wie nachfolgend erläutert, an die DNA-Syntheseketten angeglichen.

20



55



### Formel X (X<sub>a</sub>, V-O; X<sub>b</sub>, V-NH)

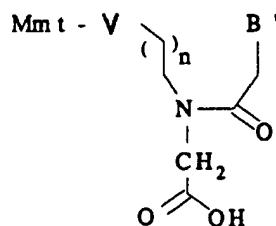
40



### Formel VIII

55

	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>2</sup>	V
VIII a	NC-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O-	-N(i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	H	O
VIII b	CH <sub>3</sub>	-N(i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	H	O
VIII c	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-N(i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	H	O
VIII d	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -C(O)-S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S	-N-pyrrolidin-1-yl	H	O
VIII e	NC-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O-	-N(i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	O
VIII f	NC-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -O-	-N(i-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> ) <sub>2</sub>	H	NH

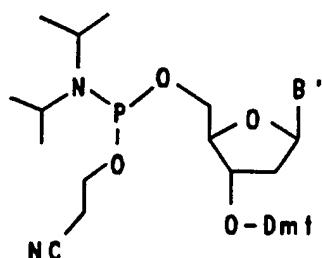


Formel IX (IXa, V=NH; IXb, V=O)

25

mit n = 1 - 8, bevorzugt 1 - 5,

30

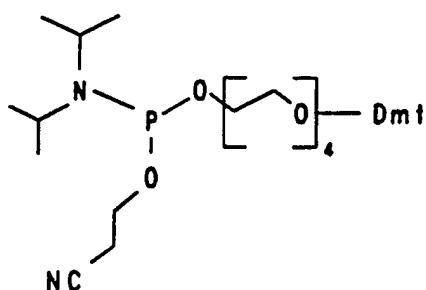


35

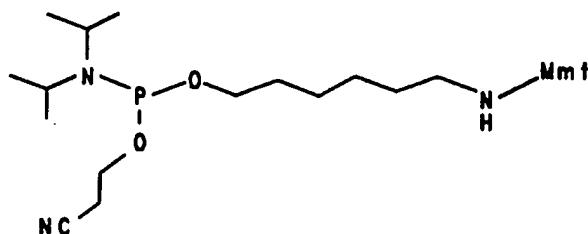
Formel XIV

45

50



### Formel XV



### Formel XVI

30

3 µmol des mit Mmt-hex-succ beladenen CPG-Trägers (Beladung 91 µmol /g) aus Beispiel 4 werden nacheinander mit folgenden Reagenzien behandelt:

### 35 Synthese des PNA-Teils (aqtgc-hex):

[00801]

- 40 1. Dichlormethan  
2. 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan  
3. Acetonitril abs.  
4. 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril (Neutralisation)  
5. 0.4 M Lösung von (Mmt-Aeg( $c^{BuBz}$ )-OH) aus Beispiel 5 in Acetonitril:DMF=9:1 / 0.9 M Lösung von ByBOP in Acetonitril / 3.5 M Lösung von 4-Ethylmorpholin in Acetonitril (10 Minuten Kupplungszeit).  
45 6. Schritt 5 wird viermal wiederholt.  
7. Acetonitril

[0081] Die Schritte 1 bis 7, nachfolgend ein PNA-Reaktionszyklus genannt, werden zum Aufbau des PNA-Teils 3-mal wiederholt, wobei in Schritt 5 jeweils der laut Sequenz erforderliche Monomerbaustein aus den Beispielen 5 bis 8 eingesetzt wird.

Konjugation des Linkers (agtc-hex ---> (but)-agtc-hex):

[0082]

55

8. Schritte 1 bis 4 von oben wiederholen  
9. 4-Nitrophenyl-4-(4, 4'-Dimethoxytrityloxy)-butyrat (105 mg) aus Beispiel 10 und Hydroxybenzotriazol (27 mg) in 2mL NEM in DMF für 15 Stunden

10. Waschen mit DMF
11. Waschen mit Acetonitril
12. Dichlormethan

5      Synthese des DNA-Teils

((but)-agtc-hex) --> 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex):

[0083]

- 10
13. Acetonitril abs.
  14. 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
  15. Acetonitril abs.
  16. 10 µmol 5'-O-Dimethoxytritylthymidin-3'-phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit und 50 µmol Tetrazol in 0.3 ml Acetonitril abs.
  17. Acetonitril
  18. 20 % Acetanhydrid in THF mit 40% Lutidin und 10 % Dimethylaminopyridin
  19. Acetonitril
  20. Jod (1.3 g in THF/Wasser/Pyridin; 70:20:5=v:v:v)

- 20
- [0084]** Die Schritte 13 bis 20, nachfolgend ein DNA-Reaktionszyklus genannt, werden zum Aufbau des Nucleotid-Teils 10-mal wiederholt, wobei im Schritt 16 jeweils das der Sequenz entsprechende 5'-O-Dimethoxytrityl(nucleobase)-3'phosphorigsäure-β-cyanoethylester-diisopropylamidit eingesetzt wird.
- [0085]** Nach abgeschlossener Synthese erfolgt die Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe wie in den Schritten 1 bis 3 beschrieben. Durch 1.5-stündige Behandlung mit Ammoniak wird das Oligomer vom Träger gespalten und zugleich werden die β-Cyanoethyl-Gruppen eliminiert. Zur Abspaltung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird die ammoniakalische Lösung 5 Stunden bei 55°C gehalten. Vom erhaltenen Rohprodukt (325 OD<sub>260</sub>) an 5'-ATC GTC GTA TT-(but)-agtc-hex werden 180 OD<sub>260</sub> durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese gereinigt. Nach Entsalzung über eine Biogel®-Säule (Fa. Biorad) erhält man davon 50 OD<sub>260</sub> hochreines Oligomer.

30     Beispiel 18

5'-ATC GTC GTA TT-(Oeg(t))-agtc-hex

35     (Beispiel für den Strukturtyp Xa in Schema 2; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

- [0086]** Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben, wobei jedoch im Schritt 9 anstelle des Dmt-buttersäure-p-nitrophenylesters der Linkerbaustein Mmt-Oeg(t)-OH aus Beispiel 9 unter den in Schritt 5 beschriebenen Bedingungen gekuppelt wird. Vom erhaltenen Rohprodukt (235 OD<sub>260</sub>) an 5'-ATC GTC GTA TT-(Oeg(t))-agtc-hex werden 135 OD<sub>260</sub> durch Polyacrylamid-Gelektrophorese gereinigt. Nach Entsalzung über eine Biogel®-Säule (Fa. Biorad) erhält man davon 20 OD<sub>260</sub> hochreines Oligomer.

Beispiel 19

45     N-ggg g(5'NH-C)T C<sub>S</sub>C<sub>S</sub>A<sub>S</sub> TGG GG<sub>S</sub>G<sub>S</sub> T (Sequenz gegen HSV-1)

(Beispiel für den Strukturtyp XI in Schema 2; s bedeutet eine Phosphorothioat-Brücke; (5'NH-C) bedeutet einen 5'-Aminocytidyl-Rest; N gleich Aminoterminus)

- 50
- [0087]** Die Synthese erfolgt ausgehend von einem CPG-Träger, welcher 5'-Dmthymidin über dessen 3'-Ende gebunden hält. Es wird zunächst wie in Beispiel 17 beschrieben die Synthese des DNA-Teils durchgeführt (Schritte 13 bis 20), wobei im Falle der Phosphorothioat-Brücken (s) die Oxidation im Schritt 20 mit Tetraethylthiuramdisulfid (TETD; User Bulletin No. 65 der Firma Applied Biosystems Inc.) erfolgt. Als Linkerbaustein wird ein Dmt-geschützter 5'-Amino-5'-desoxy-cytidylat-3'-phosphoramidit-Baustein der Formel VIIIf eingesetzt. Danach werden die PNA-Bausteine analog zu den Schritten 1 bis 7 in Beispiel 17 ankondensiert. Nach abgeschlossener Synthese wird das Oligomer durch 1.5-stündige Behandlung mit Ammoniak vom Träger gespalten und zugleich werden die β-Cyanoethyl-Gruppen eliminiert. Zur Abspaltung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird die ammoniakalische Lösung 5 Stunden bei 55°C gehalten. Erst dann wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei

## EP 0 672 677 B1

22°C abgespalten. Das Produkt wird mittels Polyacrylamid-Gelektrophorese gereinigt und über eine Biogel®-Säule (Fa. Biorad) entsalzt.

### Beispiel 20

5

5'-G<sub>Me</sub>G<sub>Me</sub>G GCT CCA (Oeg(t))gg ggg t-hex

(Beispiel für den Strukturtyp Xa in Schema 2; Me bedeutet eine Methylphosphonat-Brücke; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

10

[0088] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, wobei aber zum Einbau der Methylphosphonatbrücken Me die entsprechenden Methylphosphonat-Bausteine der Formel VIIIb im DNA-Reaktionszyklus eingesetzt werden.

15

### Beispiel 21

5'-C<sub>S,S</sub>A<sub>S,S</sub>C GT<sub>S,S</sub>T GAG (but)Ggg cat-hex (c-myc antisense)

(Beispiel für den Strukturtyp XIIa in Schema 1; S,S bedeutet eine Phosphorodithioat-Brücke).

20

[0089] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben, jedoch wird zum Einbau der Dithioat-Brücken der Baustein VIId eingesetzt und an diesen Stellen die Oxidation (Schritt 20) mit TETD durchgeführt.

### Beispiel 22

25

N-cga g(5'NH-A)A CAT CA (Oeg(t))ggt cg-hex(c-fos antisense)

(5'NH-A bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyadenylat; Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

30

[0090] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, wobei nach Abschluß der DNA-Synthese analog zu Beispiel 13 ein 5'-Aminonucleotid ankondensiert wird, welches die Konjugation des zweiten PNA-Teils erlaubt. Es werden also zuerst sechs PNA-Synthesezyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sieben DNA-Synthesezyklen durchgeführt, wobei im letzten Zyklus der Baustein der Formel VIIIf eingesetzt wird. Nachdem noch vier PNA-Synthesezyklen durchgeführt wurden, wird die Abspaltung vom Träger und weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 19 beschrieben vorgenommen.

### Beispiel 23

40

F-cga g(5'NH-A)A CAT CAT GGT S<sub>S</sub>C<sub>S</sub>G-O-CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>-O-C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>

(5'NH-A bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyadenylat; F einen Fluorescein-Rest am Aminoterminus des PNA und S eine Phosphorothioat-Brücke)

45

[0091] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 19 beschrieben, jedoch ausgehend von einem CPG-Träger, der den Glycerol-hexadecylether gebunden hält. Nach Ausführung von 12 DNA-Synthesezyklen wird der Linkerbaustein VIIIf ankondensiert. Nachdem vier PNA-Synthesezyklen durchgeführt und die endständige Mmt-Gruppe abgespalten wurde, kann die freie Aminofunktion mit einem 30-fachen Überschuß an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) quantitativ umgesetzt werden.

50

### Beispiel 24

3'-CCC TCT T-5'-(PEG)(PEG)-(Oeg(t))tg tgg g-hex

(PEG bedeutet einen Tetraethylenglycolphosphatrest)

55

[0092] Die Synthese erfolgt bezüglich des PNA-Teils analog wie in Beispiel 17 beschrieben. Nachdem sechs PNA-Einheiten ankondensiert wurden, wird das (Mmt-Oeg(t)-OH) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Als Linker wird dann wie im DNA-Synthesezyklus beschrieben zunächst zweimal das Tetraethylengylcoldervat der Formel XV ankondensiert, be-

vor die Synthese des DNA-Teils mit umgekehrter Orientierung (von 5' nach 3') durchgeführt wird. Dazu verwendet man in den DNA-Synthesezyklen anstelle der Nucleosid-3'-phosphoramidite im Schritt 16 jeweils die entsprechenden Nucleosid-5'-phosphoramidite der Formel XIV, die kommerziell erhältlich sind. Die weitere Entschützung und Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 17 beschrieben.

5

#### Beispiel 25

N-ccc tct t-(C6-link)(PEG)-3'-AAG AGG G-5'

10

(PEG bedeutet einen Tetraethylenglycolphosphatrest; C6-link ist ein 6-Aminohexanolphosphatrest)

**[0093]** Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 (DNA-Synthesezyklus) beschrieben, jedoch ausgehend von einem CPG-Träger, der 3'-O-Dmt-Desoxyguanosin über eine 5'-O-Succinatgruppe gebunden hält. Nachdem sechs DNA-Einheiten mit Hilfe der Bausteine der Formel XIV ankondensiert wurden, wird als Linker zunächst einmal das Tetraethylenglycoldervat der Formel XV ankondensiert, bevor zur Einführung von C6-link das Phosphoramidit der Formel XVI gekuppelt wird. Danach wird der PNA-Teil wie in Beispiel 17 (PNA-Synthesezyklus) an synthetisiert. Die weitere Entschützung und Aufarbeitung erfolgt wie in Beispiel 19 beschrieben.

#### Beispiel 27

20

(FAM ist Fluorescein-Rest)

5'-FAM-TTT TTT TTT (but) ttt ttt-hex

25

**[0094]** Das trägergebundene DNA/PNA-Hybrid aus Beispiel 26 wird fluoreszenzmarkiert, indem die Schritte 13 bis 20 wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt werden, wobei im Schritt 16 das Fluorescein-phosphoramidit der Fa. Applied Biosystems eingesetzt wird.

#### Beispiel 28

30

5'-GGG GGG GGG (but) ttt ttt-hex

**[0095]** Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben. Bevor das Produkt vom Träger gespalten und entschützt wird, entnimmt man eine Hälfte des trägergebundenen DNA/PNA-Hybrids zur Fluoreszenzmarkierung (Beispiel 29). Die andere Hälfte wird wie in Beispiel 17 beschrieben entschützt und aufgearbeitet. Die Titelverbindung bindet als Triplex-forming Oligonucleotid mit hoher Affinität an einen DNA-Doppelstrang, der das Homopurin-Motiv 5'-AAA AAA GGG GGG GGG-3' enthält.

#### Beispiel 29

40

(FAM ist Fluorescein-Rest)

5'-FAM-GGG GGG GGG (but) ttt ttt-hex

45

**[0096]** Das trägergebundene DNA/PNA-Hybrid aus Beispiel 28 wird fluoreszenzmarkiert, indem die Schritte 13 bis 20 wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt werden, wobei im Schritt 16 das Fluorescein-phosphoramidit der Fa. Applied Biosystems eingesetzt wird.

#### Beispiel 30

50

Biotin-C<sub>Phe</sub>G<sub>Phe</sub>A GAA cat ca t(5'NH-G)G(Ome)U(Ome) C(Ome)G(Ome)-VitE (c-fos antisense)

(N(Ome) bedeutet eine Nucleotideinheit N mit einer 2'-O-Methoxygruppe; <sub>Phe</sub> bedeutet eine Phenylphosphonat-Brücke; 5'NH-G bedeutet 5'-Amino-5'-desoxyguanylacetat).

55

**[0097]** Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 17 beschrieben ausgehend von CPG, welches mit Vitamin E beladen ist (MacKellar et al. (1992) Nucleic Acids Res, 20(13), 3411-17) und viermalige Kupplung des Bausteins der Formel VIIe nach dem DNA-Synthesezyklus. Nach Aufkupplung des 5'-Aminonucleotid-Bausteins der Formel VIIIf

werden sechs PNA-Einheiten nach dem PNA-Synthesezyklus ankondensiert. Nach Neutralisation wird nach bekannter Methode das Phosphoramidit auf die Aminofunktion gekuppelt und der DNA-Synthesezyklus zum Aufbau des DNA-Teils entsprechend wiederholt, wobei im Falle der Phenylphosphonat-Brücken die Bausteine der Formel VIIc in Schritt 16 eingesetzt werden. Zuletzt erfolgt die Aufkopplung der Endgruppe mit dem Biotin-Phosphoramidit der Fa.

- 5 Glen Research. Nach abgeschlossener Synthese wird das Oligomer wie in Beispiel 19 beschrieben entschützt, wobei die Dimethoxytritylgruppe am Ende durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22°C abgespalten wird.

Beispiel 31

- 10 A CAT CA (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisense)

(Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9)

[0098] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben. Dabei werden zuerst fünf PNA-Synthesezyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein Oeg(t) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sechs DNA-Synthesezyklen durchgeführt. Anschließend wird die Abspaltung vom Träger und die weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 18 beschrieben vorgenommen.

Beispiel 32

- 20 A TAA TG (Oeg(t)) tct cg-hex (control oligomer for c-fos)

[0099] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben. Dabei werden zuerst fünf PNA-Synthesezyklen durchgeführt und dann der Linkerbaustein Oeg(t) aus Beispiel 9 aufgekuppelt. Danach werden sechs DNA-Synthesezyklen durchgeführt. Anschließend wird die Abspaltung vom Träger und die weitere Aufarbeitung wie in Beispiel 18 beschrieben vorgenommen.

Beispiel 33

- 30 a cat cat ggt cg-hex (c-fos antisense)

[0100] Dieses reine PNA-Oligomer wurde als Referenzverbindung analog wie in Beispiel 18 hergestellt, jedoch mit der Ausnahme, daß zwölf PNA-Cyclen durchgeführt wurden. Die Entschüttung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird in ammoniakalischer Lösung (5 Stunden bei 55° C) durchgeführt. Erst dann wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22° C abgespalten.

Beispiel 34

- 40 A (5-hexy-C)A(5-hexy-U) (5-hexy-C)A (Oeg(t)) ggt cg-hex (c-fos antisense) (Erklärung für Oeg(t) vgl. Beispiel 9; 5-hexy-C bedeutet 5-Hexinyl-cytidin, 5-Hexy-U bedeutet 5-Hexinyl-uridin)

[0101] Die Synthese erfolgt analog wie in Beispiel 31 beschrieben, wobei jedoch anstelle der normalen Pyrimidin-Phosphoramidite die entsprechenden 5-Hexinylpyrimidin-nucleosid-phosphoramidite in die Kondensationsreaktion eingesetzt werden.

45 Beispiel 36

taa tac gac tca cta (5'HN-T)

- 50 (5'HN-T bedeutet 5'-Amino-5'-desoxythymidin)

[0102] Dieses PNA/DNA-Oligomer, das aus 15 PNA-Einheiten und einer Nucleosid-Einheit aufgebaut ist, wurde als Primer für die DNA-Polymerase-Reaktion synthetisiert. Dabei geht man von einem Festphasen-Träger (Aminoalkyl-CPG) aus der das 5-Monomethoxytritylamo-5'-deoxythymidin über dessen 3'-Hydroxygruppe als Succinat gebunden hält. Nach Abspaltung der Monomethoxytritylgruppe mit 3 % TCA in Dichlormethan werden 15 PNA-Cyclen wie in Beispiel 17 beschrieben durchgeführt. Die Entschüttung der exozyklischen Amino-Schutzgruppen wird in ammoniakalischer Lösung (5 Stunden bei 55° C) durchgeführt. Erst dann wird die Monomethoxytritylgruppe durch 2-stündige Behandlung mit 80 %-iger Essigsäure bei 22° C abgespalten. Man erhält ein PNA/DNA-Oligomer mit einer freien

3'-Hydroxygruppe, welche als Primer für eine DNA-Polymerase (Klenow) dient.

Beispiel 37

5  $p_S\text{-rA(2'5')rA(2'5')rA(2'5')rA\text{-spacer-(Oeg(t))tc ctc ctg cg-g-hex}}$

( $p_S$  bedeutet ein 5'Thiophosphat; spacer bedeutet ein Triethylenglycolphosphat; rA ist ein Riboadenylat; (2'5') bedeutet, daß die Internucleotidbindung von 2' nach 5' in der Ribose verläuft)

- 10 [0103] Die Synthese dieser Verbindung erfolgt analog wie in Beispiel 18 beschrieben, indem zunächst 14 PNA-Einheiten ankondensiert werden. Nachdem der Linkerbaustein Mmt-Oeg(t)-OH aus Beispiel 9 unter den in Schritt 5 beschriebenen Bedingungen eingeführt wurde, spaltet man die Mmt Gruppe mit 3 % TCA ab und führt den Spacer mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Dmt-O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>-O-P(-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)N(i-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>3</sub> Spacer-Phosphoramidits (Fa. Eurogentech; Brüssel) ein. Das (2'5')-verknüpfte Tetraadenylat wird wie in Beispiel 17 beschrieben mit Hilfe des käuflichen N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-Dmt-3'-O-tertbutyldimethylsilyl-adenosin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidits (Fa. Milligen, Bedford, USA) an synthetisiert, wobei die Kondensationszeit auf 2 x 5 Min. verlängert wird. Anstelle von Tetrazol wird in der Kupplungsreaktion der stärkere Aktivator 5-Ethylthiotetrazol eingesetzt. Nach Abspaltung der letzten Dmt-Gruppe wird das Oligomer mit Bis(β-cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphoran an der 5'-OH-Gruppe phosphoryliert. Nach Oxidation mit TETD und Entschützung mit Ammoniak und Desilylierung mit Fluorid erhält man die Titelverbindung, welche RNase L stimuliert.
- 15
- 20

Beispiel 38

25  $p_S\text{-Co(2'5')Co(2'5')Co(2'5')Co\text{-spacer-(Oeg(t))tc ctc ctg cg-g-hex}}$

( $p_S$  bedeutet ein 5'Thiophosphat; spacer bedeutet ein Triethylenglycolphosphat; Co ist Cordycepin (3'-Deoxyadenosin); (2'5') bedeutet, daß die Internucleotidbindung von 2' nach 5' in verläuft)

- 30 [0104] Die Synthese wird analog wie in Beispiel 37 durchgeführt, jedoch wird anstelle des N<sup>6</sup>-Benzoyl-5'-O-Dmt-3'-O-tert-butylsilyl-adenosin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidits das entsprechende N<sub>6</sub>-Benzoyl-5'-O-Dmtcordycepin-2'-O-cyanoethyl-di-isopropylamino-phosphoramidit (Fa. Chemogen, Konstanz) eingesetzt und die Fluoridbehandlung entfällt.

Beispiel 40

35 Charakterisierung der PNA/DNA-Hybride

[0105] Die Charakterisierung erfolgt mit Hilfe der HPLC, Polyacrylamid-Gelektrophorese (PAGE) und Negativionen Elektrospray Massenspektrometrie (ES-MS'). Die Produkte werden wie oben beschrieben gereinigt und zeigen danach bei der PAGE (20% Acrylamid, 2% Bisacrylamid und 7 M Harnstoff) eine einheitliche Bande. Die HPLC erfolgt auf Reversed Phase Säulen RP-18 der Fa. Merck (Eluent A: Wasser mit 0.1% TFA, B: Wasser/Acetonitril = 1:4; linearer Gradient) oder auf einer PA-100-Säule der Fa. Dionex (Eluent A: 20 mM NaOH und 20 mM NaCl; B: 20 mM NaOH und 1.5 M NaCl; linearer Gradient).

Für die ES-MS werden die PNA/DNA-Hybride durch Ammoniumacetat-Fällung oder andere Umsalzung in die Ammonium-Salze übergeführt. Die Probenaufgabe erfolgt aus einer Lösung in Acetonitril/Wasser (1:1) mit 5 OD<sub>260</sub>/ml Oligomer. Die Genauigkeit der Methode liegt bei ca. ± 1.5 Dalton.

Beispiel 41

50 Bestimmung der Zellaufnahme und Stabilität nach radioaktiver Markierung

Radioaktive Markierung:

- 55 [0106] Eine allgemein anwendbare Markierung mit <sup>35</sup>S besteht darin, daß man bei der Synthese des DNA-Teils mindestens eine Oxidation im DNA-Synthesezyklus (Schritt 20 in Beispiel 17) mit elementarem <sup>35</sup>S durchführt. PNA/DNA-Hybride, die eine freie 5'-Hydroxygruppe haben, können mit Hilfe der Polynukleotid-Kinase nach an sich bekannten Methoden mit <sup>32</sup>P oder <sup>35</sup>S markiert werden. PNA/DNA-Hybride, die eine freie 3'-Hydroxygruppe tragen, können nach bekannter Art mit 3'-terminaler Transferase markiert werden. Als Beispiel ist hier die 5'-Markierung des DNA-Teils

wiedergegen: Das PNA/DNA-Hybrid mit einer freien 5'-Hydroxygruppe (500 pmol) aus Beispiel 17 oder 18 wird in 425 µl Wasser gelöst, diese Lösung auf 90°C erhitzt und abgeschreckt. Dann gibt man 50 µl 10 x Kinase-Puffer und 50 µl  $^{32}\text{P}$  Gamma-ATP (6000 Ci/ mmol) bzw.  $^{35}\text{S}$ -Gamma-ATP zu und inkubiert 1 Stunde bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0.5 M EDTA-Lösung gestoppt. Die Entsalzung erfolgt mit Hilfe einer NAP<sup>R</sup>-Säule der Firma Pharmacia.

5

Bestimmung der Zellaufnahme:

[0107] Man inkubiert Vero-Zellen in 96-Napf Mikrotiterplatten in DMEM, 5 % FCS für 24 Stunden bei 37°C. Nachdem 10 das Medium entfernt wurde, wäscht man die Zellen noch zweimal mit serumfreien DMEM. Das radioaktiv markierte Oligomer ( $10^8\text{ cpm}$ ) wird mit nichtmarkiertem Oligomer auf eine Konzentration von 10 µM in Serum verdünnt und die Zellen bei 37°C damit inkubiert. Nach 1, 7 und 24 Stunden werden jeweils 150 µl entnommen (Bezeichnung: "Überstand 1"). Die Zellen in den Näpfen der Mikrotiterplatten werden 7-mal mit 300 µl frischem Medium gewaschen und die vereinigten Waschmedien (Bezeichnung: "Überstand 2") im Szintillationszähler gemessen. Danach gibt man 100 µl Trypsinlösung zu, wartet 30 Sekunden und zieht den Überstand ab. Zur Ablösung der Zellen von der Platte inkubiert 15 man 3 Min. bei 37°C. Die abgelösten Zellen werden in 1.5 ml Eppendorf-gefäße übergeführt und bei 2000 rpm für 6 Minuten zentrifugiert ("Überstand 3"). Die Überstände 1 (5µl), 2 und 3 (0.5 ml) werden jeweils separat am Szintillationszähler gemessen. Daraus errechnet sich die Aufnahme des Oligomers in pmol per 100 000 Zellen, wobei Überstand 3 die zellgebundene Oligomerfraktion und die Summe der Überstände 1 und 2 die nicht zellgebundene Oligomerfraktion darstellen.

20

Untersuchung der Stabilität des Oligomers im Medium mit Zellen:

[0108] Der Überstand 1 (10 µl) wird mit 5 µl 80 % Formamid (mit Xylencyanol und Bromphenolblau) gemischt, auf 25 95°C erhitzt (5 Minuten) und auf ein Polyacrylamidgel (20 % Acrylamid, 7 M Harnstoff) geladen. Nach der Entwicklung des Gels im elektrischen Feld ordnet man die Banden auf dem Gel mittels Autoradiographie dem "Stabilen Oligomer" bzw. die Fehlbanden dem "abgebauten Oligomer" zu.

[0109] Das PNA/DNA-Oligomer aus Beispiel 31 besitzt unter diesen Bedingungen (nach 24 Stunden Inkubationszeit) eine Halbwertszeit von 32 h, während das entsprechende DNA-Oligonucleotid eine Halbwertszeit von ca. 2 h aufweist.

30

Beispiel 42

Bestimmung der Zellaufnahme nach Fluoreszenz-Markierung:

[0110] Man lässt die COS-Zellen bis zur Konfluenz in Dulbecco's MEM, das mit 10 % FCS supplementiert wurde, in 35 5 cm Petrischalen heranwachsen. Die Zellen werden zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen. Mit Hilfe einer sterilen Nadel wird eine Fläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> in der Mitte der Petrischale eingekratzt. In diese Fläche wird die zu untersuchende PNA/DNA-Oligomerlösung (0.1 mM) aufgebracht. Es wird bei 37°C unter CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Nach 40 2, 4 und 16 Stunden werden die Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dazu werden die Zellen viermal mit serumfreien DMEM gewaschen, mit einem Glasträger abgedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bzw. durch Phasenkontrast bewertet. Als Vergleich zu den PNA/DNA-Hybridmolekülen wird ein fluoreszenzmarkiertes PNA (ohne DNA-Teil) untersucht.

40

Beispiel 43

45

Bestimmung der Schmelztemperaturen:

[0111] Die Bestimmung der Schmelztemperaturen erfolgen mit Hilfe eines HP 8452A Diodenarray-Spektrophotometers, eines HP 89090A Peltier-Elements und der HP Temperature Control Software Rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). 50 Es wird in 0.5°C/min. Schritten in 10mM HEPES und 140 mM NaCl (pH 7.5) als Puffer gemessen. Die Oligomerkonzentration beträgt 0.5 bis 1 OD<sub>260</sub> pro ml.

[0112] Ergebnis für das Produkt aus Beispiel 17 bzw. 18:

55

$T_M$  gegen DNA

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

	5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a gtc-hex 3'-TAG CAG CAT A A T CAG-5'	$T_M = 51.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ antiparallel
	5'-ATC GTC GTA T(Oeg(t)a gtc-hex 3'-TAG CAG CAT A A T CAG-3'	$T_M < 20^\circ\text{C}$ parallel
	5'-ATC GTC GTA TT(but)a gtc-hex 3'-TAG CAG CAT AA T CAG-5'	$T_M = 51.0 \text{ } ^\circ\text{C}$ antiparallel
	5'-ATC GTC GTA TTA GTC-3' 3'-TAG CAG CAT AAT CAG-5'	$T_M = 50.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ DNA-DNA antiparallel
	5'-ATC GTC GTA TT(but) a gtc-hex 5'-TAG CAG CAT AA T CAG-3'	$T_M < 20^\circ\text{C}$ parallel

## Sequenz

			$T_m$	$T_m$
			gegen DNA	gegen RNA
			(T = U)	
5				
10	5'- ACA TCA TGG TCG -3'	DNA	ap	50.7 °C
	3'- TGT AGT ACC AGC -5'			48.6 °C
15				
20	5'- ACA TCA tgg tcg -3'	(PNA-DNA)	ap	54.5 °C
	3'- TGT AGT ACC AGC -5'			54.7 °C
25				
30	5'- ACA TCA tgg tcg -3'	(PNA-DNA)	p	20 °C
	5'- TGT AGT ACC AGC -3'			< 20 °C
35				
40	5'- aca tca tgg tcg -3'	PNA	ap	58.8 °C
	3'- TGT AGT ACC AGC -5'			66.6 °C
45				
50	5'- aca tca tgg tcg -3'	PNA	p	46.3 °C
	5'- TGT AGT ACC AGC -3'			44.8 °C
40	5'- ACA TCA <u>TGG TCG</u> -3'	S-DNA	ap	46.7 °C
	3'- TGT AGT ACC AGC -5'			43.8 °C

TGG TCG bedeutet ein DNA-Teil, bei dem alle Internucleotid-Bindungen als Phosphorothioat vorliegen. Definition für p und ap s. Seite 5.

50 Beispiel 44

Testung auf antivirale Aktivität:

55 [0113] Die antivirale Aktivität der Prüfsubstanzen gegen verschiedene humanpathogene Herpesviren wird im Zellkulturtestsysten untersucht. Für den Versuch werden Affennierenzellen (Vero,  $2 \times 10^5$ /ml) in serumhaltigem Dulbecco's MEM (5 % Fötales Kälberserum FCS) in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das serumhaltige Medium wird dann abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit serumfreiem Dulbecco's MEM

(-FCS) überspült. Die Testsubstanzen werden in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 600 µM vorverdünnt und bei -18°C aufbewahrt. Für den Test erfolgen weitere Verdünnungsschritte in Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Je 100 µl der einzelnen Prüfsubstanzverdünnungen werden zusammen mit 100 µl serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) zu den gespülten Zellen gegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden die Zellen mit Herpes simplex 5 Virus Typ 1 (ATCC VR733, HSV-1 F-strain) oder mit Herpes simplex Virus Typ 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-Strain) infiziert in Konzentrationen, bei denen der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen vollkommen zerstört wird. Bei HSV-1 beträgt die Infektionsstärke 500 Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro Napf, bei HSV-2 350 PFU/Napf. Die Versuchsansätze enthalten dann Prüfsubstanz in Konzentrationen von 80 µM bis 0,04 µM in MEM, ergänzt durch 100 U/ml Penicillin G und 100 mg/l Streptomycin. Alle Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt mit Ausnahme der Kontrollen, die achtfach je Platte durchgeführt werden. Die Versuchsansätze werden 17 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Cytotoxizität der Prüfsubstanzen wird nach 20 h Gesamtinkubationszeit durch mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen bestimmt. Als Dosis tolerata maxima (DTM) wird die höchste Präparatkonzentration bezeichnet, die unter den genannten Versuchsbedingungen noch keine mikroskopisch erkennbaren Zellschädigungen hervorruft. Es erfolgt daraufhin die Zugabe von FCS auf eine Endkonzentration von 4 % mit weiterer Inkubation für 55 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. 10 Die unbehandelten Infektionskontrollen zeigen dann einen kompletten cytopathischen Effekt (CPE). Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellkulturen werden diese dann mit Neutralrot entsprechend dem Vitalfarbungsverfahren nach Finter (1966) angefärbt. Die antivirale Aktivität einer Testsubstanz wird definiert als minimale Hemmkonzentration (MHK), die benötigt wird, um 30-60 % der Zellen vor dem virusbedingten cytopathogenen Effekt zu schützen. Die 15 Aktivität der PNA/DNA-Chimären ist jeweils besser als die der entsprechenden DNA-Oligomeren oder PNA-Oligomeren.

20

#### Beispiel 45

##### Bestimmung der in vivo Aktivität: Inhibition der c-Fos Protein-Expression in der Ratte:

25 [0114] Die Bestimmung erfolgt wie beschrieben (Sandkühler et al. (1991) in : Proceedings of the VIth World Congress on Pain, Charlton and Woolf, Editors; Elsevier, Amsterdam; Seite 313-318) durch Superfusion des Rückenmarks. Nach Laminektomy einer Barbiturat-anästhesierten Sprague-Dawley Ratte wird ein Zweikammer-Behältnis aus Silikon zur Aufnahme des Antisense Oligomers gebildet. Eine Kammer wird mit dem Antisense PNA/DNA-Derivat gefüllt, während 30 die andere Kammer mit dem Kontroll Oligomer gefüllt wird (Konzentration je 75 µM). Jeweils nach einer Stunde wird das Superfusat ausgetauscht. Nach 6 Stunden Superfusion wird die c-fos Expression durch Hitzebehandlung (52°C) der Hinterläufe stimuliert. Die Inhibitor der c-fos Expression kann immunhistochemisch an entsprechenden Gewebeschneidproben nachgewiesen werden. Das c-fos Antisense-Oligonucleotid aus Beispiel 31 bewirkt eine stärkere Inhibition der c-fos Expression als das entsprechende DNA-Oligonucleotid und das entsprechende PNA-Oligomer aus 35 Beispiel 33.

#### Beispiel 46

##### RNase-H-Assay

40 [0115] Zur Bestimmung der RNase-H-Aktivität werden 1.3 OD des zu untersuchenden PNA/DNA-Oligomers mit 0.5 OD der komplementären RNA-Sequenz (Target-Sequenz) in 50 µl autoklaviertem, mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser, gelöst; 5 Minuten auf 80 °C erwärmt und anschließend binnen 15 Minuten auf 37 °C abgekühlt. Hierdurch werden zunächst beide Oligomere denaturiert, die nach Abkühlen in sequenzspezifischer Weise einen Nucleinsäure-Doppelstrang ausbilden.

45 [0116] Für den Test inkubiert man diesen RNA-PNA/DNA-Duplex mit 10 µl RNase H 10x Puffer, 1 µl Dithiothreitol (DTT) und 2 µl (entsprechend 10 u) RNase H der Firma USB. Der Inkubationsansatz wird mit autoklaviertem, DEPC behandeltem Wasser, auf das gewünschte Gesamtvolumen von 100 µl vervollständigt. Die Proben werden bei 37 °C inkubiert. Für die kinetische Untersuchung wurden nach 0, 2 min, 10 min, und 1 h jeweils 20 µl der Lösung abgenommen, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und bei - 70 °C bis zur Analyse eingefroren. Die Untersuchung der RNase H-Spaltung der RNA erfolgt durch Gelelektrophorese. Es zeigte sich, daß PNA/DNA-Hybride, die Desoxyribonucleotid-Bausteine enthalten, die RNase H aktivieren, wobei der komplementäre RNA-Strang gespalten wird, während das PNA/DNA-Oligomer unversehrt aus der Reaktion hervorgeht. Die Spaltungsreaktion mit dem PNA/DNA-Oligomer verläuft etwas langsamer als mit einem entsprechenden Oligodeoxyribonucleotid gleicher Länge und Sequenz.

55

Beispiel 47

Herstellung eines HeLa-Zellextraktes mit RNase L-Aktivität

- 5 [0117] Um die Aktivität der zellulären Endoribonuklease L durch die 2'5'-Tetraadenylat-PNA/DNA-Konjugate zu stimulieren, wurde ein HeLa-Zellextrakt hergestellt. Dazu versetzt man 35 Flaschen mit je 20 ml Medium mit Dulbeccos MEM (minimal essential medium) und 10 % FCS (fötales Kälberserum). Die Ernte der Zellen kann nach Trypsinbehandlung vorgenommen werden. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm werden 4 ml Zellernte erhalten. Diese füllt man zunächst mit 4 ml Wasser auf und gibt nach 3 Minuten 4 ml Puffer A (5,48 g HEPES; 15,5 g KCl; 2,488 g Mg-Aacetat; 10 1232 µl 2-Mercapto-ethanol ad 1 l Wasser) zu, um die Zellen zu lysieren. Anschließend zentrifugiert man die Lösung für 30 Minuten bei 0 °C in einer Ultrazentrifuge bei 30.000 rpm (ca. 100.000 g). Der Überstand von 8 ml Zellextrakt wird abgenommen und für die folgenden Untersuchungen bei - 20 °C eingelagert.

Beispiel 48

- 15 19 Untersuchung auf Aktivierung der RNase L

- [0118] Für die Untersuchung dieses Extraktes auf die Endonuklease L werden zunächst 0.3 OD der RNA-Targetsequenz mit den jeweiligen PNA/DNA-Oligomeren 5 Minuten auf 80 °C erwärmt und anschließend zur Hybridisierung 20 auf 37 °C abgekühlt. Der Duplex wird mit 20 µl des Extraktes, 1.2 µl Glycerin und RNase L-Puffer versetzt und bei 37 °C inkubiert. Das Gesamtvolumen beträgt anschließend 70 µl. Für die kinetischen Untersuchungen werden Proben 25 zu den Zeiten 0, 20 und 60 Minuten abpipettiert und zur Denaturierung der Enzyme 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Proben werden in einem Speedvac lyophilisiert und durch Gelelektrophorese analysiert. Die PNA-2'5'-Tetradenylat-Konjugate bzw. Tetracordycepin-Analoga aktivieren die zelluläre RNase L, während entsprechende Verbindungen ohne den Tetraadenylat-Teil die RNase L nicht stimulieren.

Beispiel 49

DNA-Polymerase-Reaktion

- 30 [0119] Als Templat für die DNA-Polymerase Reaktion dient folgendes 81-mer Oligodeoxynucleotid:

35 5'-GCC CCA GGG AGA AGG CAA CTG GAC CGA AGG CGC TTG TGG AGA  
AGG AGT TCA TAG CTG GGC TCC CTA TAG TGA GTC GTA TTA-3'

Die Sequenz des PNA/DNA-Primers ist:

- 40 [0120]

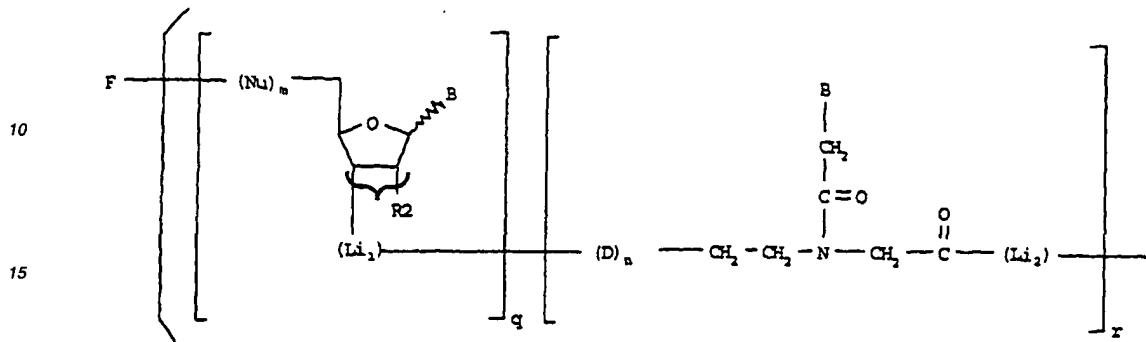
H-taa tac gac tca cta (5NH-T)-OH 3'.

- 45 [0121] Als Kontroll-Primer wird ein entsprechendes Oligodeoxynucleotid der Sequenz 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG-3' eingesetzt.  
[0122] Der Primer (0.15 nmol) und das Templat (0.15 nmol) in 5 µl 10x PCR Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH9, 1 % Triton X-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) werden mit 35 µl Wasser verdünnt und durch Erhitzen auf 95°C und Abkühlen 50 hybridisiert. Dann gibt man 10 µl 2mM dNTP-Mischung (Nucleosid-5'triphosphate) und 3 µl DNA-Polymerase (Klenow Fragment) zu und inkubiert je 0.5 Stunden bei 22 °C und 37 °C. Die Reaktionslösung wird danach auf einem 10 % Polyacrylamid-Gel (mit 1 % Bis) analysiert. Als Marker trägt man pBR322/HaeIII-Verdau auf. Die Reaktion mit dem Kontroll-Primer zeigt ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit der erwarteten Größe relativ zum Marker, während das Produkt aus dem PNA/DNA-Primer etwas schneller wandert. In beiden Fällen wandert in der Gelelektrophorese der 55 Doppelstrang wesentlich schneller als der Templat-Einzelstrang.

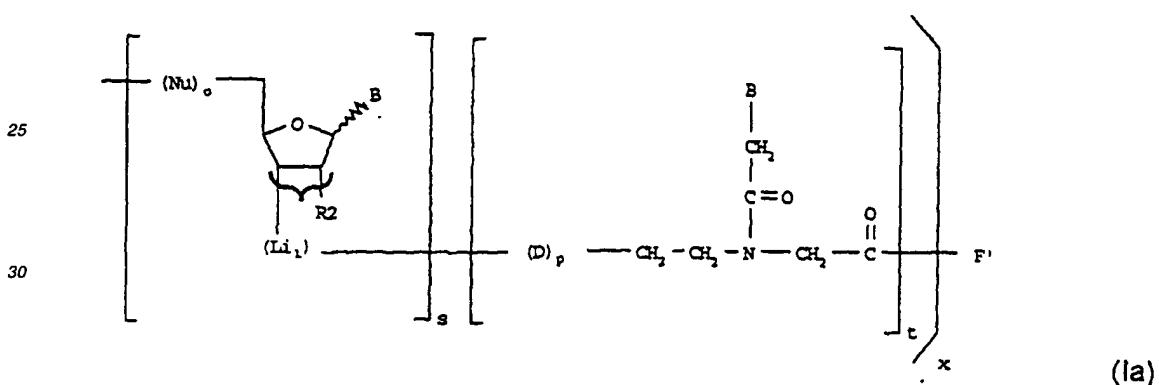
## Patentansprüche

## 1. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel Ia

5



20



35

wobei

x 1 ist und

q = r = 1 und s = t = Null oder

r = s = 1 und q = t = Null oder

q = r = s = 1 und t = Null sind;

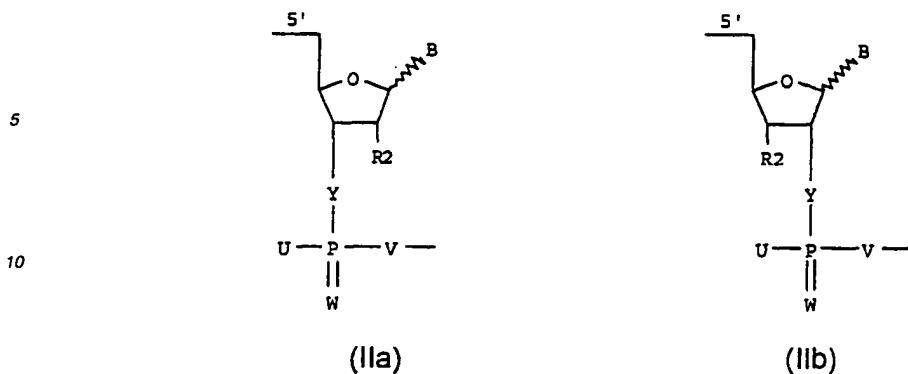
45

R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, Halogen, Azido oder Amino bedeutet;  
 B unabhängig voneinander für eine in der Nucleotidchemie übliche Base steht,  
 und die "geschweifte Klammer" andeutet, daß sich R<sup>2</sup> und der benachbarte Substituent in 2'- und  
 3'-Stellung oder auch umgekehrt in 3'- und 2'-Stellung befinden können, und wobei die Polyamid-  
 struktur mindestens eine Nucleobase enthält, die von Thymin verschieden ist;

Nu für einen Rest der Formeln IIa oder IIb steht

50

55



worin

R<sup>2</sup> und B wie oben definiert sind;20 U Hydroxy, Mercapto, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Aryl, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl, NHR<sup>3</sup> oder NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> bedeutet und25 R<sup>3</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-Alkyl oder C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyl ist, undR<sup>4</sup> C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl ist oder25 R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup> zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterozyklischen Ring bedeu- tet, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus ^ der Reihe O, S, N enthalten kann;

V Oxy, Sulfanidyl oder Imino bedeutet;

W Oxo oder Thioxo bedeutet;

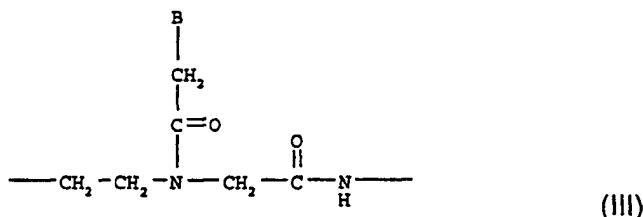
Y Oxy, Sulfanidyl, Methylen oder Imino bedeutet;

30 m = Null bis 20;

o = Null bis 20;

D einen Rest der Formel III bedeutet,

35



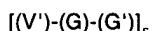
45 worin B wie oben definiert ist;

n = Null bis 20;

p = Null bis 20;

Li<sub>1</sub> und Li<sub>2</sub> unabhängig voneinander jeweils eine Struktur der Formel V

50



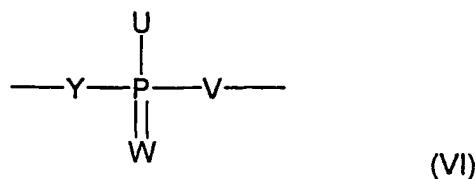
(V)

ist, wobei unabhängig voneinander

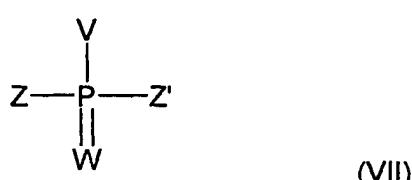
55

ε = 1 bis 5 ist,

V' Sauerstoff, NH, eine Bindung oder einen Rest der Formel VI



- 10 bedeuten,  
worin U, V, W und Y wie oben definiert sind;
- G C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkandiyl, wobei Alkandiyl gegebenenfalls durch Halogen, Amino, Hydroxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl oder C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl substituiert sein kann; C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-di-C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>-Alkandiyl oder einer Gruppe der Formel (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>δ</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, worin δ gleich 1 bis 11 sein kann; oder für eine Bindung stehen kann; und
- 15 G' Oxy, Sulfanidyl, Imino, -C(O)-, -C(O)NH-, eine Bindung oder einen Rest der Formel VI bedeuten, worin U, V, W und Y wie oben definiert sind; und
- F und F' über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind (cyclische Verbindungen) oder F und F' Endgruppen sind,
- 20 die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen,  
die die Markierung ermöglichen,  
die an Nukleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen oder
- F für R<sup>0</sup> - (A)<sub>k</sub> - V - und  
F' in Formel Ia für -(Q)<sub>l</sub> - R<sup>1</sup> steht,  
wobei
- 25 R<sup>0</sup> Wasserstoff, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkanoyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkoxy carbonyl, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkanoyl, C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-Aroyl, C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub>-Heteroaroyl oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift; oder,  
falls k = Null ist, R<sup>0</sup> Wasserstoff ist oder zusammen mit V für einen Rest der Formel VII
- 30



- steht, worin  
40 Z und Z' unabhängig voneinander Hydroxy, Mercapto, C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkoxy, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Aryl, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-Aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylothio, NHR<sup>3</sup>, NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, oder eine Gruppe bedeuten, die die intrazelluläre Aufnahme des Oligomers begünstigt oder als Markierung einer DNA-Sonde dient oder bei der Hybridisierung des Oligomers an die target-Nucleinsäure diese unter Bindung, Quervernetzung oder Spaltung angreift, und worin  
45 R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, V und W wie oben definiert sind;
- R<sup>1</sup> Wasserstoff oder Q<sup>0</sup>  
wobei R<sup>1</sup> immer nur dann Wasserstoff ist,  
wenn gleichzeitig l = Null und  
in Formel Ia t = Null und s = 1 und Li<sub>1</sub> eine Struktur der Formel V mit V = Bindung, G = Bindung,  
ε = 1 und G' = Oxy, Sulfanidyl, Imino oder einen Rest der Formel VI mit U = Z
- 50

bedeuten,

- A und Q unabhängig voneinander den Rest einer natürlichen oder unnatürlichen Aminosäure bedeuten;  
55 Q<sup>0</sup> Hydroxy, OR', NH<sub>2</sub>, NHR" bedeutet mit  
R' = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl und  
R" = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Aminoalkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-Hydroxyalkyl;  
V wie oben definiert ist;

k Null bis 10 ist;  
l Null bis 10 ist;

mit der Maßgabe, daß

5

- a) falls in der Verbindung der Formel Ia t = Null und s = 1 sind, und  $L_1 = (V') - (G) - (G')$  mit  $V'$  = Verbindung der Formel VI,  $G = C_2-C_{12}$ -Alkylen und  $G' = CO$  stehen, bedeutet in  $F' = - (Q)_l - R^1$  l = Null bis 10 und  $R^1 = Q^0$ ;
- b) falls in der Verbindung der Formel Ia s = t = Null ist, steht  $L_2$  für eine Bindung;

10

wobei jedes Nucleotid in seiner D- Konfiguration vorliegt und sich die Base in  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Stellung befinden kann.

15

2. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate der Formel Ia gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** sich die Base in  $\beta$ -Stellung befindet.

20

3. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei Endgruppen, die die intrazelluläre Aufnahme begünstigen ausgewählt werden aus verschiedenen lipophilen Reste wie  $-O-(CH_2)_x-CH_3$ , worin x eine ganze Zahl von 6 bis 18 bedeutet,  $-O-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$ , worin n und m unabhängig voneinander eine ganze Zahl von 6 bis 12 bedeuten,  $-O-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_9-CH_3$ ,  $-O-(CH_2CH_2O)_8-(CH_2)_{13}-CH_3$  und  $-O-(CH_2CH_2O)_7-(CH_2)_{15}-CH_3$ , aber auch Steroid-Reste wie Cholesterin oder Vitamin-Reste wie Vitamin E, Vitamin A oder Vitamin D und andere Konjugate, die natürliche Carriersysteme ausnutzen wie Gallensäure, Folsäure, 2-(N-Alkyl, N-Alkoxy)-Aminoanthrachinon und Konjugate der Mannose und Peptide der entsprechenden Rezeptoren, die zur receptorvermittelten Endozytose der Oligonucleotide führen wie EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin und PDGF (Platelet Derived Growth Factor); und Endgruppen, die die Markierung ermöglichen, ausgewählt werden aus fluoreszierenden Gruppen beispielsweise Dansyl-(=N-Dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), Fluorescein- oder Coumarin-Derivaten oder chemilumineszierende Gruppen beispielsweise von Acridin-Derivaten, das über ELISA nachweisbare Digoxigenin, die über das Biotin/Avidin-System nachweisbare Biotin-Gruppe oder aber Linker-Arme mit funktionellen Gruppen, die eine nachträgliche Derivatisierung mit nachweisbaren Reporter-Gruppen gestatten, beispielsweise ein Aminoalkyl-Linker, der mit einem Acridinium-Aktivester zur Chemilumineszenz-Probe umgesetzt wird; und

25

Endgruppen, die die Nukleinsäuren binden bzw. interkalieren und/oder spalten oder quervernetzen, ausgewählt werden aus Acridin-, Psoralen-, Phenanthridin, Naphtochinon-, Daunomycin- oder Chlorethylaminoaryl-Konjugaten.

30

4. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei A und Q unabhängig voneinander ausgewählt werden aus der Reihe Glycin, Leucin, Histidin, Phenylalanin, Cystein, Lysin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Prolin, Tetrahydroisoquinolin-3-carbonsäure, Octahydroindol-2-carbonsäure und N-(2-Aminoeethyl)glycin.

35

5. Polyamid-Oligonucleotid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei B unabhängig voneinander ausgewählt wird aus der Reihe der natürlichen Basen Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin, Uracil, Inosin oder unnatürliche Basen Purin, 2,6-Diaminopurin, 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-Ethanocytosin, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-Ethano-2,6-diaminopurin, Pseudoisocytosin, 5-Methylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkinylluracil und 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynylcytosin oder deren Prodrugformen.

40

6. Verfahren zur Herstellung von Polyamid-Oligonucleotid-Derivaten gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet, daß** man sukzessive eine PNA-Einheit bzw. DNA-Einheit mit jeweils einer Nucleobase an einen entsprechend derivatisierten Träger oder an eine wachsende Oligomerkette ankondensiert.

45

7. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Anwendung als Heilmittel.

50

8. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Anwendung als Heilmittel bei der Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden oder von Erkrankungen, die durch Integreine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflußt werden, bei der Behandlung von Krebs oder bei der Verhinderung der Restenose.

55

9. Arzneimittel enthaltend ein Polyamid-Oligonucleotid-Derivat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

10. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Anwendung als Gensonde.

11. Polyamid-Oligonucleotid-Derivate gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennz lchn t, daß sich an mindestens einem Ende eine Nucleosid-Einheit mit einer 3'-Hydroxygruppe befindet, zur Anwendung als Primer.
12. Gensonden-Assay zur Bestimmung eines Oligo- bzw. eines Polynucleotid-Targets (RNA bzw. DNA), dadurch g - k nnz lchn t, daß man eine Gensonde nach Anspruch 10 in einem homogenen oder heterogenen Assay einsetzt.
13. Gensonden-Assay zur Bestimmung eines Oligo- bzw. eines Polynucleotid-Targets (RNA bzw. DNA), dadurch ge- kennzeichnet, daß man einen Primer gemäß Anspruch 11 einsetzt.
14. Gensonden-Assay gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Target durch Hybridisierung nach einer Targetamplifikation bestimmt wird.

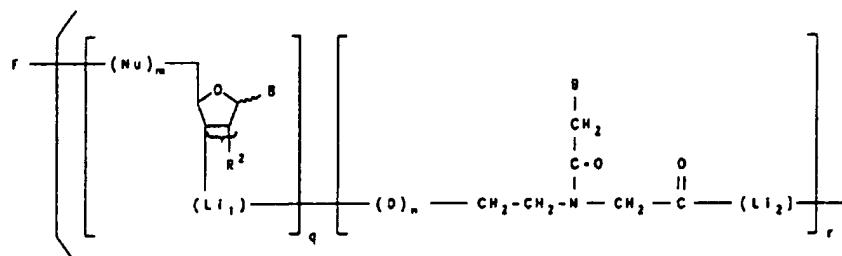
## Claims

15

1. A polyamide-oligonucleotide derivative of the formula Ia

20

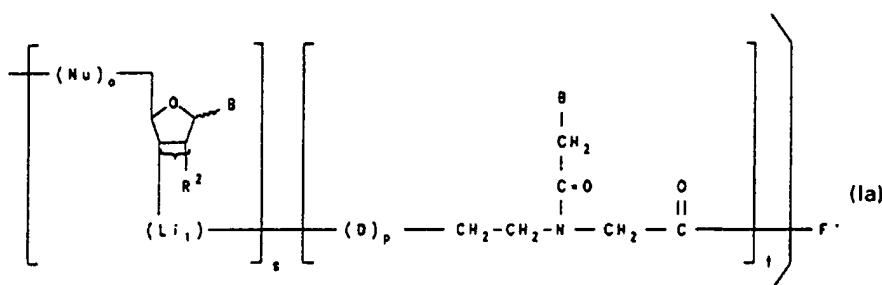
25



30

35

40



where

45

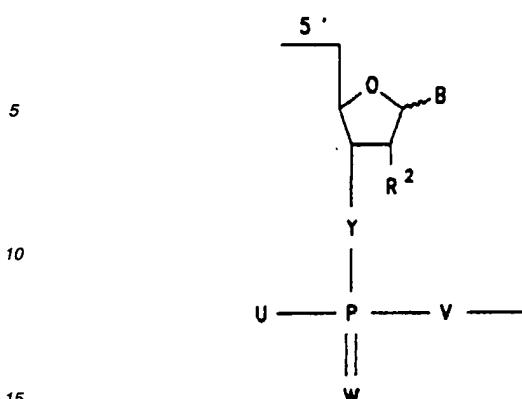
x is 1 and  
 $q = r = 1$  and  $s = t = \text{zero}$  or  
 $r = s = 1$  and  $q = t = \text{zero}$  or  
 $q = r = s = 1$  and  $t = \text{zero}$ ;

R<sup>2</sup>

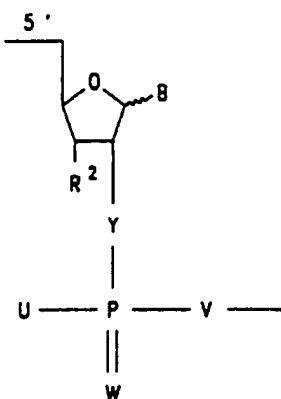
is hydrogen, hydroxyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-alkoxy, halogen, azido or amino;  
B is, independently of one another, a base customary in nucleotide chemistry,  
and the "curved bracket" indicates that R<sup>2</sup> and the adjacent substituent can be in the 2' position and 3' position or else conversely in the 3' position and 2' position,  
and in which the polyamide structure contains at least one nucleotide base which is different from thymine;

55

Nu is a radical of the formulae IIa or IIb



( 11 a )



( 1 1 b )

20

in which

**R<sup>2</sup>** and **B** are as defined above;

U is hydroxyl, mercapto, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-alkoxy, C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-aryl, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-aryl-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-alkyl, NHR<sup>3</sup> or NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, and

$R^3$  is  $C_1$ - $C_{18}$ -alkyl or  $C_1$ - $C_4$ -alkoxy- $C_1$ - $C_4$ -alkyl, and

$R^4$  is  $C_1-C_{18}$ -alkyl or

**30 R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup>** is, together with the nitrogen atom carrying them, a 5-6-membered heterocyclic ring which can additionally contain another heteroatom from the series consisting of O, S, N;

V is oxy, sulfanidyl or imino;

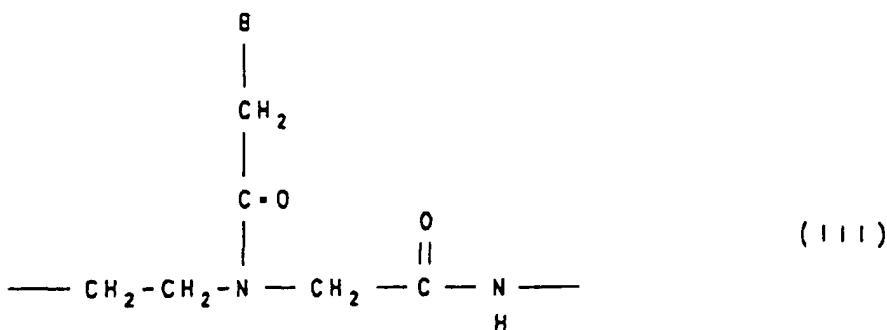
W is oxo or thioxo;

35      Y            is oxy, sulfanidyl, methylene or imino;  
          m            is zero to 20;

- o is zero to 20;

D is a radical of the

8



in which B is as defined above;

n is zero to 20;

**p** is zero to 20;

$\text{Li}_1$  and  $\text{Li}_2$  are each, independently of one another, a structure of the formula V

$[(V')-(G)-(G')]_{\epsilon}$ 

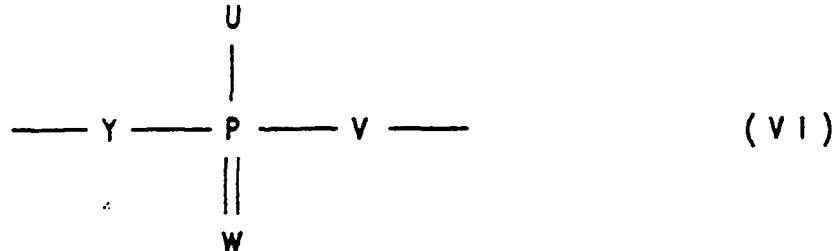
(V)

where, independently of one another,

5

$\epsilon$  is 1 to 5,  
 $V'$  is oxygen, NH, a bond or a radical of the formula VI

10



15

20

in which

U, V, W and Y are as defined above;

G can be  $C_1-C_{12}$ -alkanediyl, where alkanediyl can optionally be substituted by halogen, amino, hydroxyl,  $C_1-C_{18}$ -alkyl,  $C_1-C_{18}$ -alkoxy,  $C_6-C_{14}$ -aryl, or  $C_6-C_{14}$ -aryl- $C_1-C_{18}$ -alkyl;  $C_6-C_{14}$ -aryl-di- $C_1-C_{12}$ -alkanediyl, or a group of the formula  $(CH_2CH_2O)_{\delta}CH_2CH_2$  in which  $\delta$  can be 1 to 11; or a bond; and

G' is oxy, thio, imino,  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NH-$ , a bond or a radical of the formula VI in which U, V, W and Y are as defined above; and

F and F' are linked to one another by a covalent bond (cyclic compounds) or F and F' are end groups which favor intracellular uptake,

30

which enable labeling,  
 which bind to nucleic acids, or  
 intercalate and/or cleave or  
 crosslink or

F is  $R^0 - (A)_k - V -$  and

F' in formula Ia is  $-(Q)_j - R^1$

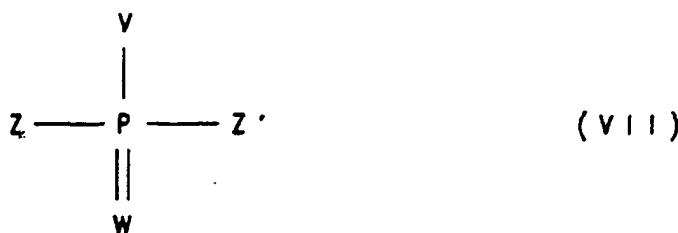
where

$R^0$  is hydrogen,  $C_1-C_{18}$ -alkanoyl,  $C_1-C_{18}$ -alkoxycarbonyl,  $C_3-C_8$ -cycloalkanoyl,  $C_7-C_{15}$ -aryloyl,  $C_3-C_{13}$ -heteroaryloyl or a group which favors intracellular uptake of the oligomer or serves as labeling of a DNA probe or, in the hybridization of the oligomer onto the target nucleic acid, attacks the latter with bonding, crosslinking or cleavage; or

40

if k is zero,  $R^0$  is hydrogen or together with V is a radical of the formula VII

45



50

in which

55

Z and Z' are, independently of one another, hydroxyl, mercapto,  $C_1-C_{22}$ -alkoxy,  $C_1-C_{18}$ -alkyl,  $C_6-C_{20}$ -aryl,  $C_6-C_{14}$ -aryl- $C_1-C_{18}$ -alkyl,  $C_1-C_{22}$ -alkylthio,  $NHR^3$ ,  $NR^3R^4$ , or a group which favors intracellular uptake of the oligomer or serves as labeling of a DNA probe or, in the hybridization of the oligomer onto the target nucleic acid, attacks the latter with bonding, cross-linking or cleavage, and in which

R<sup>1</sup> R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, V and W are as defined above;  
 is hydrogen or Q<sup>0</sup>  
 where R<sup>1</sup> is always only hydrogen when at the same time t is zero and in formula Ia s is zero and s is 1 and Li<sub>1</sub> is a structure of the formula V with V' = bond, G = bond, ε = 1 and G' = oxy, thio, imino or a radical of the formula VI with U = Z  
 A and Q are, independently of one another, the residue of a natural or unnatural amino acid;  
 Q<sup>0</sup> is hydroxyl, OR', NH<sub>2</sub>, NHR" with

10 R' = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-alkyl and  
 R" = C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-alkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-aminoalkyl, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-hydroxyalkyl;

V is as defined above;  
 k is zero to 10;  
 l is zero to 10;

15 with the proviso that

- a) if in the compound of the formula Ia t is zero and s is 1, and Li<sub>1</sub> is (V') - (G) - (G') with V' = a compound of the formula VI, G = C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>-alkylene and G' = CO, in F' = - (Q)<sub>1</sub> - R<sup>1</sup> l is zero to 10 and R<sup>1</sup> is Q<sup>0</sup>;  
 b) if in the compound of the formula Ia s = t = zero, Li<sub>2</sub> is a bond;

where each nucleotide can be in its D configuration, and the base can be in the α or β position.

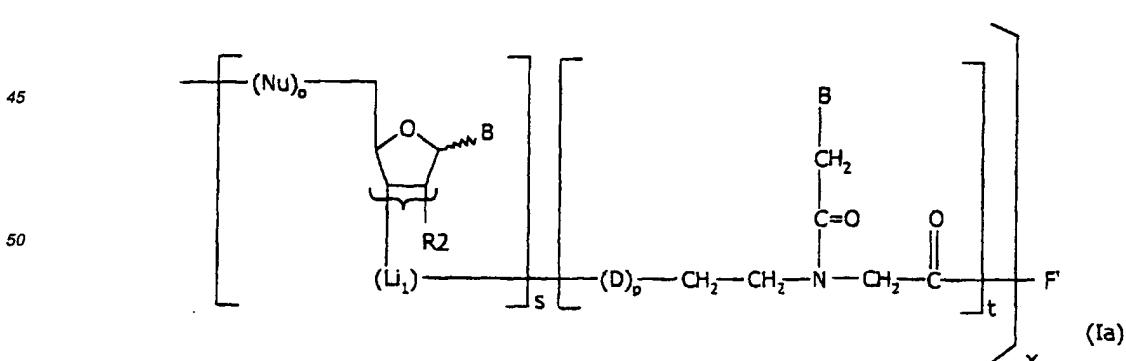
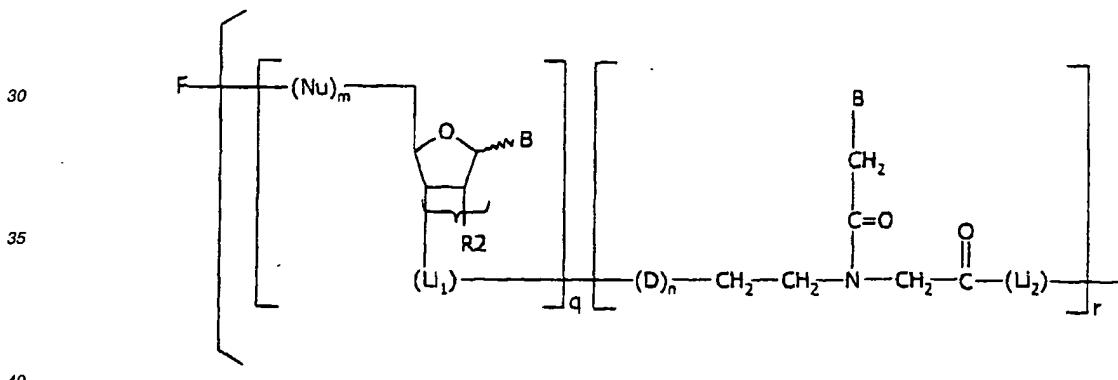
2. A polyamide-oligonucleotide derivative of the formula Ia as claimed in claim 1, wherein the base is in the β position.  
 25
3. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in either of claims 1 or 2, where end groups which favor intracellular uptake are selected from various lipophilic radicals such as -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>-CH in which x is an integer from 6 to 18, -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CH<sub>3</sub> in which n and m are, independently of one another, an integer from 6 to 12, -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-CH<sub>3</sub>, -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>8</sub>-(CH<sub>3</sub>)<sub>13</sub>-CH<sub>3</sub> and -O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>15</sub>-CH<sub>3</sub>, but also steroid residues such as cholestryl or vitamin residues such as vitamin E, vitamin A or vitamin D and other conjugates which utilize natural carrier systems such as bile acid, folic acid, 2-(N-alkyl, N-alkoxy)-aminoanthraquinone and conjugates of mannose and peptides of the appropriate receptors which lead to receptor-mediated endocytoses of the oligonucleotides, such as EGF (epidermal growth factor), bradykinin and PDGF (platelet derived growth factor); and end groups which enable labeling, are selected from fluorescent groups, for example dansyl (=N-dimethyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl), fluorescein or coumarin derivatives or chemiluminescent groups, for example of acridine derivatives, digoxigenin which is detectable by ELISA, the biotin group which is detectable via the biotin/avidin system, or else linker arms with functional groups which allow subsequent derivatization with detectable reporter groups, for example an aminoalkyl linker, which is reacted with an acridinium active ester to give a chemiluminescent sample; and end groups which bind or intercalate and/or cleave or crosslink the nucleic acids, selected from acridine, psoralen, phenanthridine, naphthoquinone, daunomycin or chloroethylaminoaryl conjugates.  
 30
- 40
4. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 3, where A and Q are, independently of one another, selected from the series of glycine, leucine, histidine, phenylalanine, cysteine, lysine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, proline, tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid, octahydroindole-2-carboxylic acid and N-(2-aminoethyl)glycine.  
 45
5. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 4, where B is, independently of one another, selected from the series of natural bases adenine, cytosine, thymine, guanine, uracil, inosine or unnatural bases purine, 2,6-diaminopurine, 7-deazadenine, 7-deazaguanine, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-ethanocytosine, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-ethano-2,6-diaminopurine, pseudouracil, 5-methylcytosine, 5-fluorouracil, 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-alkynyluracil and 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-alkynlcytosine or their prodrug forms.  
 50
- 55
6. A process for the preparation of polyamide-oligonucleotide derivatives as claimed in any of claims 1 to 5, which comprises successive condensation of a PNA unit or DNA unit with, in each case, one nucleotide base onto an appropriately derivatized support or onto a growing oligomer chain.
7. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 5 for use as medicine.

8. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 5 for use as medicine for the treatment of diseases caused by viruses or of diseases influenced by integrins or cell-cell adhesion receptors, for the treatment of cancer or for preventing restenosis.
- 5     9. A pharmaceutical containing a polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 5.
- 10    10. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 5 for use as gene probe.
- 10    11. A polyamide-oligonucleotide derivative as claimed in any of claims 1 to 5, wherein a nucleoside unit having a 3'-hydroxyl group is located on at least one end for use as primer.
- 15    12. A gene probe assay for the determination of an oligo- or polynucleotide target (RNA or DNA), wherein a gene probe as claimed in claim 10 is used in a homogeneous or heterogeneous assay.
- 15    13. A gene probe assay for the determination of an oligo- or polynucleotide target (RNA or DNA), wherein a primer as claimed in claim 11 is used.
- 20    14. A gene probe assay as claimed in either of claims 12 and 13, wherein the target is determined by hybridization after target amplification.

**Revendications**

1. Dérivés de polyamide-oligonucléotides de formule Ia

25



où

x est 1 et  
q = r = 1 et s = t = 0 ou  
r = s = 1 et q = t = 0 ou  
q = r = s = 1 et t = 0 ;

5

R<sup>2</sup> représente l'hydrogène, hydroxyle, alcoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, halogène, azido ou amino,  
les B représentent indépendamment les uns des autres une base courante en chimie des nucléotides,  
et l'accolade indique que R<sup>2</sup> et le substituant voisin peuvent se trouver en position 2' et 3' ou encore  
inversement en position 3' et 2', et où la structure polyamide contient au moins une base nucléique qui  
n'est pas la thymine,  
Nu représente un reste de formule IIa ou IIb

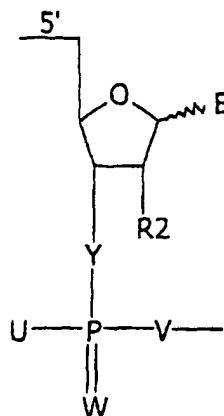
10

15

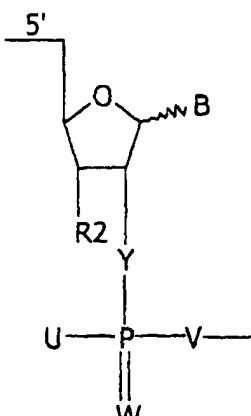
20

25

30



(IIa)



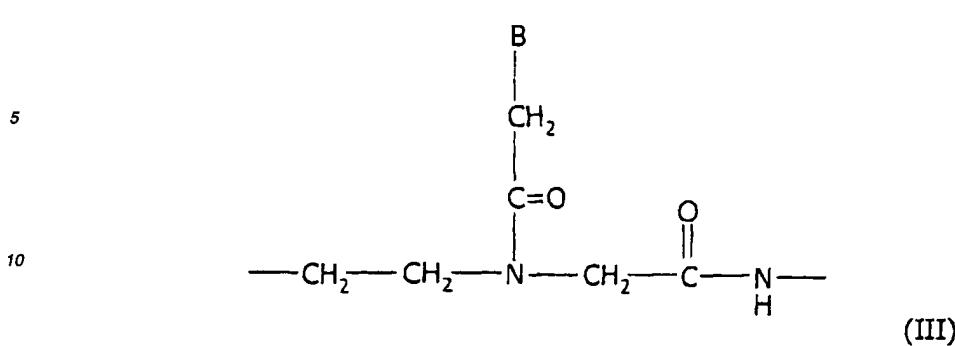
(IIb)

où

R<sup>2</sup> et B sont définis comme ci-dessus ;  
U représente hydroxyle, mercapto, alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alcoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>, aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>, NHR<sup>3</sup> ou NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup> et  
R<sup>3</sup> est alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> ou alcoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, et  
R<sup>4</sup> est alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> ou  
R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> représentent avec l'atome d'azote qui les porte un cycle hétérocyclique à 5-6 chaînons qui peut contenir en outre un autre hétéroatome de la série de O, S, N,  
V représente oxy, sulfanidyle ou imino ;  
W représente oxo ou thioxo ;  
Y représente oxy, sulfanidyle, méthylène ou imino ;  
m = 0 à 20 ;  
o = 0 à 20 ;  
D représente un reste de formule III

50

55



15 où B est défini comme ci-dessus ;

n = 0 à 20 ;

p = 0 à 20 ;

Li<sub>1</sub> et Li<sub>2</sub> représentent chacun indépendamment l'un de l'autre une structure de formule V

20

$$[(V')-(G)-(G')] \varepsilon \quad (V)$$

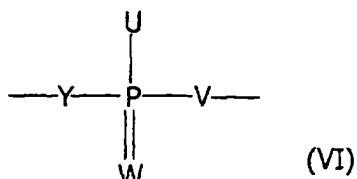
où, indépendamment l'un de l'autre

25

$\varepsilon$  = 1 à 5,

V' représente l'oxygène, NH, une liaison ou un reste de formule VI

30



où

U, V, W et Y sont définis comme ci-dessus ;

40 G représente alcanediyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, où l'alcane diyle peut éventuellement être substitué par halogène, amino, hydroxyle, alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alcoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> ou aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>; aryle en C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-dialcanediyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> ou un groupe de formule (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>δ</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, où δ peut être égal à 1 à 11 ; ou une liaison ; et

G' représente oxy, sulfanidyle, imino, -C(O)-, -C(O)NH-, une liaison ou un reste de formule VI, où U, V, W et Y sont définis comme ci-dessus ; et

45 F et F' sont liés l'un à l'autre par une liaison covalente (composés cycliques) ou bien F et F' sont des groupes terminaux, qui favorisent l'absorption intracellulaire, qui permettent le marquage,

50

qui se lient aux acides nucléiques ou qui s'intercalent dans les acides nucléiques et/ou qui clivent ou réticulent les acides nucléiques, ou bien

F représente R<sup>0</sup> - (A)<sub>k</sub> - V - et

F' représente -(Q)<sub>l</sub>-R<sup>1</sup> dans la formule Ia,

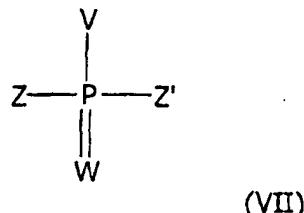
55 où

R<sup>0</sup> représente l'hydrogène, alcanoyle en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, alcoxy en C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>-carbonyle, cycloalcanoyle en C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>, aroyle en C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>, hétéroaroyle en C<sub>3</sub>-C<sub>13</sub> ou un groupe qui favorise l'absorption intra-

cellulaire de l'oligomère ou qui sert de marquage d'une sonde ADN ou qui, lors de l'hybridation de l'oligomère à l'acide nucléique cible, agit sur celui-ci par liaison, réticulation ou clivage ; ou bien,  
quand  $k = 0$ ,  $R^0$  est l'hydrogène ou représente avec  $V$  un reste de formule VII

5

10



15

où

$Z$  et  $Z'$  représentent indépendamment l'un de l'autre hydroxyle, mercapto, alcoxy en  $C_1-C_{22}$ , alkyle en  $C_1-C_{18}$ , aryle en  $C_6-C_{20}$ , aryle en  $C_6-C_{14}$ -alkyle en  $C_1-C_{18}$ , alkylthio en  $C_1-C_{22}$ ,  $NHR^3$ ,  $NR^3R^4$ , ou un groupe qui favorise l'absorption intracellulaire de l'oligomère ou qui sert de marquage d'une sonde ADN ou qui, lors de l'hybridation de l'oligomère à l'acide nucléique cible, agit sur celui-ci par liaison, réticulation ou clivage, et où

$R^3, R^4, V$  et  $W$  sont définis comme ci-dessus ;

$R^1$  représente l'hydrogène ou  $Q^0$

où  $R^1$  est seulement l'hydrogène

25

quand simultanément  $I = 0$  et

dans la formule Ia  $t = 0$  et  $s = 1$  et  $Li_1$  représente une structure de formule V avec  $V' =$  liaison,  $G =$  liaison,  $\varepsilon = 1$  et  $G' =$  oxy, sulfanidyle, imino ou un reste de formule VI avec  $U = Z$ ,

$A$  et  $Q$  représentent indépendamment l'un de l'autre le reste d'un acide aminé naturel ou non naturel ;  $Q^0$  représente hydroxyle,  $OR'$ ,  $NH_2$ ,  $NHR''$  avec

30

$R' =$  alkyle en  $C_1-C_{18}$  et

$R'' =$  alkyle en  $C_1-C_{18}$ , aminoalkyle en  $C_1-C_{18}$ , hydroxyalkyle en  $C_1-C_{18}$  ;

$V$  est défini comme ci-dessus ;

$k$  est 0 à 10 ;

$I$  est 0 à 10 ;

35

à condition que

40

- a) au cas où, dans le composé de formule Ia,  $t = 0$  et  $s = 1$ , et  $Li_1 = (V') - (G) - (G')$  avec  $V' =$  composé de formule VI,  $G =$  alkylène en  $C_2-C_{12}$  et  $G' = CO$ , dans  $F' = -(Q)_I-R^1$ ,  $I = 0$  à 10 et  $R^1 = Q^0$  ;
- b) au cas où, dans le composé de formule Ia,  $s = t = 0$ ,  $Li_2$  représente une liaison ;

où chaque nucléotide est dans sa configuration D et la base peut se trouver en position  $\alpha$  ou  $\beta$ .

45

2. Dérivés de polyamide-nucléotides de formule Ia selon la revendication 1, caractérisés en ce que la base est en position  $\beta$ .
3. Dérivé de polyamide-oligonucléotide selon l'une des revendications 1 et 2, où les groupes terminaux qui favorisent l'absorption intracellulaire sont choisis parmi différents restes lipophiles comme  $-O-(CH_2)_x-CH_3$ , où  $x$  représente un nombre entier de 6 à 18,  $-O-(CH_2)_n-CH=CH-(CH_2)_m-CH_3$ , où  $n$  et  $m$  représentent indépendamment l'un de l'autre un nombre entier de 6 à 12,  $-O-(CH_2CH_2O)_4-(CH_2)_9-CH_3$ ,  $-O-(CH_2CH_2O)_8-(CH_2)_{13}-CH_3$  et  $-O-(CH_2CH_2O)_7-(CH_2)_{15}-CH_3$ , mais aussi des restes de stéroïdes comme cholestéryle ou des restes de vitamines comme la vitamine E, la vitamine A ou la vitamine D et d'autres conjugués qui utilisent des systèmes porteurs naturels comme l'acide biliaire, l'acide folique, la 2-(N-alkyle, N-alcoxy)-aminoanthraquinone et des conjugués de mannose et de peptides des récepteurs correspondants, qui conduisent à l'endocytose des oligonucléotides à médiation par des récepteurs comme EGF (facteur de croissance épidermique), la bradykinine ou PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) ; et les groupes terminaux qui permettent le marquage sont choisis parmi les groupes fluorescents, par exemple dansyle (= N-diméthyl-1-aminonaphthyl-5-sulfonyl-), des dérivés de la fluorescéine ou de la coumarine ou les groupes chimiluminescents par exemple de dérivés de l'acridine, la digoxygénine.

nine qui peut être mise en évidence par ELISA, le groupe biotine qui peut être mis en évidence par le système biotine/avidine ou bien encore des bras lieurs à groupes fonctionnels qui permettent une transformation ultérieure en dérivés avec des groupes reporters qui peuvent être mis en évidence, par exemple un lieu aminoalkyle qui est converti avec un ester actif d'acridinium en une sonde chimiluminescente, et

5 les groupes terminaux qui se lient aux acides nucléiques ou qui s'intercalent dans les acides nucléiques et/ou qui clivent ou réticulent les acides nucléiques sont choisis parmi les conjugués d'acridine, de psoralène, de phénanthridine, de naphtoquinone, de daunomycine ou de chloroéthylaminoaryle.

- 10 4. Dérivé de polyimide-oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3, où A et Q sont choisis indépendamment l'un de l'autre dans la série de la glycine, la leucine, l'histidine, la phénylalanine, la cystéine, la lysine, l'arginine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la proline, l'acide tétrahydroisoquinoléine-3-carboxylique, l'acide octahydroindole-2-carboxylique et la N-(2-aminoéthyl)glycine.
- 15 5. Dérivé de polyamide-oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 4, où les B sont choisis indépendamment les uns des autres dans la série des bases naturelles adénine, cytosine, thymine, guanine, uracile, inosine ou des bases non naturelles purine, 2,6-diaminopurine, 7-déazaadénine, 7-déazaguanine, N<sup>4</sup>N<sup>4</sup>-éthanocytosine, N<sup>6</sup>N<sup>6</sup>-éthano-2,6-diaminopurine, pseudouracile, 5-méthylcytosine, 5-fluorouracile, 5-alcynyle en C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-uracile et 5-alcynyle en C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-cytosine ou leurs formes de précurseurs de médicaments.
- 20 6. Procédé de préparation de dérivés de polyamide-oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, **caractérisé en ce que** l'on condense successivement une unité d'ARN ou une unité d'ADN avec à chaque fois une base nucléique à un support transformé en dérivés de manière correspondante ou à une chaîne oligomère en croissance.
- 25 7. Dérivés de polyamide-oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, destinés à être utilisés comme médicaments.
- 30 8. Dérivés de polyamide-oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, destinés à être utilisés comme médicaments pour le traitement des maladies qui sont provoquées par des virus ou des maladies qui sont influencées par des intégrines ou des récepteurs d'adhésion cellule-cellule, dans le traitement du cancer ou pour éviter la resténose.
- 35 9. Médicament contenant un dérivé de polyamide-oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 5.
10. Dérivés de polyamide-oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, destinés à être utilisés comme sonde génique.
- 40 11. Dérivés de polyamide-oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, **caractérisés en ce qu'une unité de nucléoside ayant un groupe 3'-hydroxyle se trouve à au moins une extrémité**, destinés à être utilisés comme amorce.
12. Analyse à sondes géniques pour la détermination d'une cible oligo- ou polynucléotidique (ARN ou ADN), **caractérisée en ce que** l'on utilise une sonde génique selon la revendication 10 dans une analyse homogène ou hétérogène.
- 45 13. Analyse à sondes géniques pour la détermination d'une cible oligo- ou polynucléotidique (ARN ou ADN), **caractérisée en ce que** l'on utilise une amorce selon la revendication 11.
14. Analyse à sondes géniques selon l'une des revendications 12 et 13, **caractérisée en ce que** la cible est déterminée par hybridation après une amplification de la cible.